

최 종
연구보고서

전통육종 효율 극대화를 위한 분자생물학적
기술 개발

Exploitation of molecular biological techniques for
maximization of traditional breeding efficiency in
horticultural crops

배추 복합내병성 CMS계통 조기육성과 체계 확립 및 분자표지인자 개발
Establishment of a system for rapid development of cytoplasmic male sterile line
multi-resistant to club root and viral diseases and development of molecular markers for
viral disease in Chinese cabbage

Fox-hunting system을 이용한 배추 속 작물의 저발현 기능유전자 대량 획득 및
육종소재 창성
Mass-obtaining of low expressional function gene and making of breeding materials
using Fox-hunting system in Brassica

애기장대 응성불임 변이체를 이용한 임성관련 유전자의 분리 및 이용
Characterization and application of fertility-related gene isolated from Arabidopsis
male-sterile mutants

S-RNase 유전자의 RNA interference 방법에 의한 자가화합성 사과 계통 육성
The study of Self-fertile transgenic apple using S-RNase RNA interfering methods

분자마커를 이용한 무·배추의 무사마귀병 저항성 선발마커 개발
Development of molecular markers linked to clubroot disease in radish and Chinese
cabbage

연구기관
(주)바이오브리딩연구소

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “전통육종 효율 극대화를 위한 분자생물학적 기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

- 제1세부: 배추 복합내병성 CMS계통 조기육성과 체계 확립 및 분자표지인자 개발
- 제1협동: Fox-hunting system을 이용한 배추 속 작물의 저발현 기능유전자 대량 획득 및 육종소재 창성
- 제2협동: 애기장대 옹성불임 변이체를 이용한 임성관련 유전자의 분리 및 이용
- 제3협동: S-RNase 유전자의 RNA interference 방법에 의한 자가화합성 사과 계통 육성
- 제4협동: 분자마커를 이용한 무·배추의 무사마귀병 저항성 선발마커 개발

2008 년 12 월 일

주관연구기관명 : (주) 바이오브리딩연구소

총괄연구책임자 : 이수성

세부연구책임자 : 이수성

연 구 원 : 최우진

연 구 원 : 이선애

연 구 원 : 양정민

제1협동연구기관명 : 순천대학교

제1협동연구책임자 : 노일섭

제2협동연구기관명 : 경북대학교

제2협동연구책임자 : 박순기

제3협동연구기관명 : 경북대학교

제3협동연구책임자 : 최철

제4협동연구기관명 : (주)농우바이오

제4협동연구책임자 : 남석현

요약문

I. 제목 :

전통 육종의 효율 극대화를 위한 분자생물학적 기술 개발

*성격이 전혀 다른 5개 세부(협동)과제로 구성되어 있으므로 세부(협동)과제별로 기술함

제1세부: 배추 복합내병성 CMS계통 조기육성과 체계 확립 및 분자표지인자 개발

제1협동: Fox-hunting system을 이용한 배추 속 작물의 저발현 기능유전자 대량 획득 및 육종소재 창성

제2협동: 애기장대 옹성불임 변이체를 이용한 임성관련 유전자의 분리 및 이용

제3협동: S-RNase 유전자의 RNA interference 방법에 의한 자가화합성 사과 계통 육성

제4협동: 분자마커를 이용한 무·배추의 무사마귀병 저항성 선발마커 개발

제1세부: 배추 복합내병성 CMS 계통 조기육성과 그 체계 확립 및 분자표지인자 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

우리나라 배추 품종은 1960년에 시작하여 1970년대 이후에는 거의 완전히 1대잡종으로 바뀌었으며 최근에는 우량 품종이 해외로 다량 수출되고 있다. 그 품종의 경제적 다량 채종 방법은 양친의 서로 다른 자가불화합성 인자를 이용한 것인데 이 경우 양친의 유실이 용이하여 품종보호가 잘 안 되고 있다. 약 10여 년 전부터 배추의 채종을 비용이 우리나라의 1/3-1/5밖에 안 되는 중국 등 저개발국으로 점차 옮기게 되었는데 F₁ 품종의 양친을 그대로 채종포에서 가져다 증식하여 마치 자기네가 육성한 품종인 양 시판하는 예가 비일비재하게 되었다.

따라서 한 편친을 국내에서 서로 다른 두 계통을 이용하여 증식한 후 증식된 한 계통만 해외 채종포로 보냄으로서 계통의 복제가 불가능하게 하는 세포질 옹성불임성(Cytoplasmic male sterility)의 이용연구가 활발하게 되었다. 그러나 배추에 도입하여 이용할 수 있을 것으로 생각되었던 무의 Ogura CMS, 갯의 Anand CMS, 유채의 Polima CMS 등이 모두 1대잡종에서 잡종강세 현상이 나타나지 않아 이용할 수가 없음을 알게 되었다.

따라서 배추와 동일종인 소송채(*Brassica rapa* spp.)에서 발견된 CMS를 도입하여 이용하기 위한 연구를 본 과제에서 하게 되었다. 먼저 소송채 CMS에 뿌리혹병과 TuMV에 복합 저항성인 배추를 핵치환하여 복합내병성 CMS 배추를 육성하는데 DNA marker를 이용함으로써 형질 고정 세대를 BC₅F₁-BC₆F₁에서 BC₂F₁-BC₃F₁으로 크게 단축시킬 수 있는지를 확인코자 하였다. 그리고 다양한 F₁ 품종의 서로 다른 편친으로 이용할 수 있도록 결구력이 약한 A형과 결구력이 강한 B형 순계의 CMS계통을 동시에 육성코자 하였다.

나아가 배추 바이러스병(TuMV-C4) 내병성 개체(계통)의 선발 효율을 높이기 위하여 선발용 분자마커를 개발코자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

소송채 CMS에 내병성이 없는 배추 계통을 2회 교잡한 것을 기본 CMS의 재료(공여친)로 이용하고 뿌리혹병과 TuMV 및 무름병의 3대병 복합내병성 순계(DH line) 중 결구력이 약한 A형 계통과 결구력이 강한 B형 계통을 반복친으로 하여 여교잡하였다. 여교잡 과정의 분리세대 개체를 DNA marker로 검정하여 반복친에 가장 가까운 개체를 강선발함으로써

적어도 BC₃F₁에서 고정된 CMS계통을 얻도록 하였다. 그리고 이 CMS 계통에 기존의 다양한 보유 계통을 교잡하여 1대잡종을 만들고 그들의 성능을 검정하였다.

한편 바이러스병에 내병성인 순계와 이병성인 순계간의 F₁을 소포자 배양하여 얻은 반수성2배체(DH 계통)계통 또는 그 F₁에 이병성 친을 교잡하여 얻은 BC₁F₁을 이용하여 배추 바이러스병(TuMV-C4)의 내병성 개체 선발용 분자표지인자를 개발하였다.

VI. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

배추 CMS계통에 복합내병성 계통을 교잡한 분리집단의 90개체에 대하여 반복친과 함께 primer 11개로 AFLP를 수행하였다. 그 결과를 분석하여 특정 primer 4개로도 11개 primer를 이용하였을 때와 동일한 성적, 즉 반복친 유사개체를 선발할 수 있음을 알았다. 이러한 결과를 이용함으로써 AFLP 수행에 필요한 시간 경비를 대폭적으로 단축시킬 수 있었고 따라서 적기에 반복친 유사개체를 획득하여 후대채종을 할 수 있었다. 그러나 후술하는 바와 같이 보다 더 시간과 경비를 줄일 수 있는 방법이 개발되어야 할 것으로 생각된다.

B형에 속하는 한 계통은 한 세대가 빠르게 진행되었는데 뜻밖에도 여교잡 세대에서 종자가 극도로 적게 생기는 현상이 나타났다. 따라서 개체 수가 적은 경우도 있었지만 여교잡 세대가 진행될수록 AFLP의 근연계수가 급격히 높아졌으며 BC₃F₁세대에서는 그 범위가 0.95-0.98이었고 육안으로도 이형주를 구분할 수 없을 정도로 고정되었다. 이로써 AFLP 등 분자마커를 이용한 선발로 여교잡 세대를 대폭적으로 단축할 수 있음을 확신하게 되었다.

그러나 이 소송채 CMS가 이미 배추에서는 이용할 수 없는 것으로 판명된 Ogura CMS로 밝혀졌으며 여기서 고정된 복합내병성 계통의 CMS도 Ogura CMS와 동일하게 속일에 chlorosis가 생기고 잡종강세현상이 나타나지 않아 1대잡종 육성에 이용할 수 없을 것으로 생각되었다. 그런데 A형에 속하는 한 계통은 반복친에 유사하여 선발된 개체가 후대 종자를 생산하지 못하고 고사함으로써 원인인 개체로 후대를 이었는데 그 결과 BC₃F₁에서도 아직 형질이 분리하고 있다. 그러나 이 계통들 중에는 속일에 황화현상이 생기지 않고 종자가 반복친과 동일하게 생산되며 잡종강세현상도 어느 정도 나타나는 것으로 판단되는 것이 있다. 즉 소송채 CMS가 비록 Ogura CMS와 동일하지만 계통에 따라 1대잡종 종자생산에 이용 가능한 것이 있을 수 있음을 시사하고 있다.

배추 바이러스(TuMV-C4)병의 내병성 유전자와 연관된 공우성 SSR 마커를 찾았는데 마커와 내병성 유전자와의 거리는 2.2cM정도로 아주 우수하며 KS-TuMV-3으로 명명하고 특허를 신청하였다.

2. 활용에 대한 건의

분자마커를 이용하여 여교잡 세대를 단축시킬 수 있다는 사실은 이미 전 세계적으로 공인된 기술인 것 같다. 문제는 시간과 비용이다. 이 과제의 제4차와 5차년도에 외부에서 발표된 세미나를 듣고 알게 되었지만 Landmark사와 한국에 채소육종연구소를 가진 Monsanto사 및 Singenta사의 경우(세미나 및 소문) 검정하는 점당 비용이 30센트(420원) 이하로 알려지고 있다. 그런데 우리는 이 과제를 수행하면서 소요된 비용을 보면 최소한 점당 일만오천원(약 10불)정도인 것 같다. 왜 이렇게 비용의 차이가 크게 생기는지 잘 이해하고 있는 학자가 없는 것 같다. 식물 육종의 국제경쟁력을 확보를 위해 비용절감을 위한 후속 연구가 절실한 실정이다.

제1협동: Fox-hunting system을 이용한 배추속 작물의 저발현 기능유전자 대량획득 및 육종소재 창성

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 유전자의 기능을 해석하여 분리해 내는 방법으로서 유용유전자를 다량으로 확실하게 얻을 수 있는 한 방법인데 최근에 개발되고 있다. 식물의 각 기관으로부터 mRNA를 추출하고 이를 바탕으로 새로이 개발된 기술을 이용하여 full length cDNA를 다량으로 작성한 후 모든 DNA의 염기서열이 밝혀진 애기 장대에 형질전환시킨다. 그리고 애기 장대에서 나타난 변이체를 이용하여 그 관련 유전자를 분리해낸 후 다시 본래의 식물에 형질전환하여 그 유전자의 기능을 확인하는 방법이다. 이를 “Full length cDNA를 이용한 종합적 유전자 기능 해석의 식물 시스템”이라고 한다. 이 방법은 (1) 발현조절배열을 포함하는 완전장 cDNA의 library를 작성하여 이를 식물에 도입하고, (2) cDNA가 도입된 식물집단에서 목적의 선발조건에 적합한 식물체를 선발하고, (3) 선발된 식물체로부터 cDNA를 단리하고, (4) 단리된 cDNA를 도입된 식물체와 동종의 식물체에 재도입하여 선발조건에 따른 표현형질을 재확인하는 것이다. 즉 기능이 밝혀진 유전자를 다량으로 획득할 수 있는 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

형질전환계가 잘 확립되어 있는 소송채(*Brassica rapa*, S⁶⁰S⁶⁰)의 엽육조직, 줄기조직, 근조직(library I) 및 꽃잎, 화탁, 암술기관, 수술기관(library II)으로부터 각각 mRNA를 추출하여, 저발현 유전자를 포함한 full-length cDNA를 대량 획득하였다. 저발현 유전자를 포함한 full-length cDNA를 표준화한 후 cDNA의 5'말단 염기배열을 결정하여 작제된 library가 5'말단이 부가된 G로부터 시작하는지의 여부를 검토하였다. 2종의 표준화된 library를 합하여 FOX Agrobacteria library를 작제한 후, 형질전환용 vector를 구축하였다. 구축된 vector를 Arabidopsis에 형질전환한 후 자식종자를 획득하였다. 자식종자를 파종, 개화시킨 후, 형질변이체를 탐색하고, 기능유전자를 분리하였고, 분리된 기능유전자의 염기서열을 분석하고 신규 유전자는 지적재산권을 확보하였다. FOX-Agrobacterium library를 이용한 애기장대의 변이체 선발 및 유전자 기능을 해석하였다. 배추의 완전장 cDNA library로부터 ABC transpoter 유전자 분리 및 분자적 특성을 해석하였다. 배추의 완전장 cDNA library로부터 Bromelain 유전자 분리 및 형질전환한 후 무름병균에 저항성 개체를 선발하였다. Cloning된 스트레스 관련 유전자는 형질전환용 donor gene으로 활용하여 신기능성 작물의 창출에 이용할 것이며, 확인된 기능유전자를 동종의 작물에 도입하여 새로운 육종소재를 창성할 것이다.

VI. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1) Fox-hunting system을 이용하여 *B. rapa*의 균질화된 완전장 cDNA library를 작제하고 그중 5,039개의 완전장 cDNA 염기서열을 결정하였으며, 148종의 유용유전자를 full sequence하여 Genbank에 등록하였다. Osome 유래 스트레스 저항성 50 유전자의 강발현 vector를 구축하였다.

2) FOX Agrobacteria library를 애기장대에 형질전환하여 45개체의 형질변이체를 선발하였고, 선발된 형질 변이체로부터 도입된 cDNA를 PCR법에 의해 분리하였으며, 그 중 14 cDNA를 full-length sequencing하였다.

3) 배추의 완전장 cDNA library로부터 4종의 ABC transpoter 유전자 분리한 후 분자적 특성을 해석하였다.

4) 배추의 완전장 cDNA library로부터 Bromelain 유전자 분리 및 형질전환체를 육성하여 특성을 분석하였다. bromelain 유전자를 삽입한 식물발현 벡터를 배축법에 의하여 서울배추에 도입하였다. 62%로 무름병 내성이 증진되었다.

5) 본 연구에서 개발된 FOX-hunting system을 이용하여 얻은 완전장 cDNA는 *Brassica rapa* 'Osome'의 유용유전자를 다량 포함하고 있으며 스트레스 및 병 저항성 유전자는 작물에 도입하여 새로운 배추 육성에 활용될 것으로 기대된다.

제2협동: 애기장대 응성불임 변이체를 이용한 임성관련 유전자의 분리 및 이용

II. 연구개발의 목적 및 필요성

유전자 수준에서의 응성불임 현상의 연구는 식물분자발생학 연구의 모델로 사용되는 애기장대를 대상으로 수행되어왔다. 약 조직에서 특이적으로 발현하는 전사물이 대략 3500개 정도인 것으로 추성되고 있으며, 이들 중 상당부분이 전사조절인자(transcription factor) 유전자이거나, 약내의 특수화된 세포의 분화를 조절하는데 관여하는 것으로 알려져 있다.

또한 여러 종류의 돌연변이 유발원을 이용하여 선발된 응성불임 돌연변이체를 대상으로 응성불임 현상의 특성을 규명하고, 임성관련 유전자들을 클로닝하는 연구가 활발하게 수행되고 있으며, 현재까지 20여종의 돌연변이체에 관한 연구가 보고되었다. 유전자 조작을 통한 인위적인 응성불임성의 유발에 관한 연구가 활발히 수행되고 있다. 응성 및 자성불임, 자가 불화합성 및 Apomixis의 연구는 국제적으로 식물발생 연구의 가장 중요한 토픽으로 부상되고 있으며, 또한 농업적 이용의 잠재적 가능성이 매우 크기 때문에 식물생명공학을 위한 유전자조작 기술이 활발히 개발되고 있다.

따라서 가장 주요작물에 관한 응성불임 현상의 연구 및 연구결과의 농업현장에서의 활용을 위하여, 임성관련 유전자의 확보가 가장 시급한 문제이며, 이를 대상으로 체계적인 유전자 조작연구를 함으로서 1대 잡종 종자 생산과 같은 농업문제에 직접적 이용의 방안을 모색할 수 있다고 생각된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 연구과제 수행 전 이미 확보된 12종의 EMS 유발 애기장대 응성불임 돌연변이체로부터 최소한 2-3종의 임성관련 유전자를 확보하고, 이들 유전자를 이용하여 작물에서의 해당유전자를 탐색하며, 그 발현을 조절함으로써 배추의 응성불임성을 인위적으로 유기하는 방안을 모색하는 것이다.

VI. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구과제에서는 응성불임 유전자를 단지 클로닝하여 특성을 규명하는 기초연구에 그치지 않고, 획득한 유전자들을 작물에 적용하여 실제 채소작물의 포장에서 1대 잡종종자를 생산과정에 활용하는 것이다. 또한 이미 애기장대에서 알려진 유전자 정보를 이용하여 불임유발/임성조절이 가능한 응성불임계통을 육성하여 잡종종자 생산을 위한 2계통법 확립에 유용하게 활용될 수 있다. JA생합성 경로에 관여하는 AOS 유전자를 화분과 같은 특정기관에서만 발현을 억제하고, 임성회복이 필요한 개체에 포장에서 자스몬산을 살포함으로써 종자의

확보가 가능할 것으로 생각된다. 이러한 방법을 통하여 유지권이 필요치 않는 불임친, 회복친만을 사용하여 1대 잡종종자를 생산하는 2계통법이 가능할 것으로 생각된다. 특히 상업성이 높은 채소작물을 대상으로 그 활용가능성이 매우 크다. 우리나라 주요한 채소의 하나인 배추의 경우, 애기장대와 유전자구성이 매우 유사하고 유전적으로 근연종이므로 애기장대의 유전자 발현조절시스템이 동일하게 작동될 가능성이 매우 높으므로 1대 잡종종자 생산을 위한 옹성불임개체 유기에 활용할 계획이다.

제3협동: S-RNase 유전자의 RNA interference 방법에 의한 자가 화합성 사과 계통 육성

II. 연구개발의 목적 및 필요성

과실류에 있어서 사과, 배, 양앵두 등은 자가불화합성(Gammatophytic Self Incompatibility)을 가지는 대표적인 작물로서 성공적인 수분, 수정과 결실을 위해서는 수분수의 혼식이 필수불가결하다. 최근 환경오염과 기상악화 등으로 꽃가루 매개곤충의 활동이 약화되어 수정과 착과율이 감소하며 특히 해에 따라 개화시기의 기상조건이 나쁘면 착과율이 현저히 낮아지는 등 문제점이 자주 발생하고 있다. 이를 극복하기 위하여 인공으로 수분수의 화분을 가져다 수분시키는 인공수분법을 실행하여야 함으로 또한 생산비를 높이는 요인이 되고 있다.

동양배의 경우 자가화합성 품종인 오사이십세기(S4sm; 자가화합 S-allele)를 이용하여 자가결실성 품종을 육성하고 있으며, 양앵두의 경우에도 자가화합 선발계인 JI 2420 (S4'; 자가화합 S-allele; 'Emperor Francis' X 'Napoleon' pollen X-irradiation)을 이용하여 여러 자가화합성 양앵두가 개발되고 있다(Lapins, 1971). 사과에도 자가결실성 품종육성에 교배친으로 사용할 자가화합성 계통/품종이 절실히 요구되고 있으나 현재로는 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 우리나라 사과의 주품종인 'Fuji' (S₁S₉)에 S-alleles의 RNAi법을 이용하여 자가결실성인 'Fuji' 사과품종을 개발 하고자 하였다. 또한 사과 형질전환시 형질전환을 향상에 필요한 요인을 분석하여 효과적인 형질전환기술을 확립하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

사과 'Fuji' 와 'Gala'의 주두에서 발현하는 S₁- 및 S₉-RNase를 cloning하여 염기서열을 분석하고 pK7GWIWg2(II) vector를 이용하여 PCR 만으로 목적 하는 유전자인 S-RNase를 vector에 삽입하고 intron을 이용한 intron hairpin RNA(ihRNA)를 형성하게 함으로써 효율적인 gene silencing이 일어날 수 있도록 vector를 구축 확인하였다. 형질전환을 향상을 위하여 Ethylene 억제제의 이용, *Agrobacterium tumerfaciens*의 strain, post-selection 및 항생제의 농도 및 종류의 효과를 검정하였다. *Agrobacterium* 매개법에 의해 주 공시재료인 'Fuji'와 비교품종인 'Gala'에 제작된 RNAi vector 도입, 선발 및 순화 후 형질전환체를 분석 육성하도록 하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

목적유전자인 S-RNase는 사과 주두의 cDNA에서부터 allele specific primer를 이용하여 'Fuji'에서는 약 343 bp, 341 bp 인 S₁-, S₉- RNase 단편과, 'Gala'에서는 약 350 bp, 281 bp 인 S₂-, S₅- RNase 단편이 확인되었고, 염기서열을 분석한 결과 이미 보고된 S-RNase 유

전자의 염기서열과 완전일치 하였다. 이들은 'Gateway cloning system' protocol에 따라 pK7GWIWg2(II)에 삽입 확인되었다.

형질전환 효율을 높이기 위한 실험에서 'Fuji'의 경우 AVG 0.001mg/L 처리시 가장 높은 신초 재분화율을 보였다. *Agrobacterium* strain에 따른 infection효율은 LBA4404가 GV3101보다 'Fuji'와 'Gala' 두 품종 모두에서 높았다. Post-selection이 신초 재분화율에 미치는 실험에서 두 품종 공히 kanamycin에서의 선발을 2일 후부터 시작함에 따라 신초의 재분화율은 약 2배가 증가한 30%의 수준이었고, 전체적인 kanamycin 저항성 신초 재분화율도 높게 나타났다. LBA4404 *Agrobacterium* strain에서 완벽하게 균을 제거하고 신초 재분화율을 높이는 것은 'Fuji' 품종의 경우 250mg/L의 Clavamox (35.4%) 나 150mg/L 의Cefotaxime와 Clavamox 혼용 (35.1%)시 가장 효율적인 것으로 나타났고, 'Gala'의 경우도 비슷한 경향이었으나 150mg/L 의Cefotaxime와 Clavamox 혼용시 32.7%로 가장 높게 나타났다.

4-6주마다 개체증식 및 계대배양을 계속하여 이 연구에 공시된 'Fuji' 품종 외에도 'Gala', '감홍'과 '홍로'를 증식하였다. 4종의 (S₁, S₉-RNase hpRNAi for 'Fuji'; S₂, S₅-RNase hpRNAi for 'Gala') RNAi cassette를 LBA 4404 도입 후, *Agrobacterium* 매개법을 이용하여 S-genotype에 따른 vector에 따라 각각 약 600개체의 식물체에 형질전환 하였다. RNAi를 이용한 사과의 형질전환에서 'Fuji'는 약 2.6%, 'Gala'는 5.9% 의 형질전환율을 보였다.

2. 활용에 대한 건의

우리나라 사과의 주품종인 'Fuji' 에 S-alleles의 RNAi법을 이용하여 육성한 자가결실성 'Fuji'사과의 형질전환체는 타과수류에서 이용되는 것과 마찬가지로 자가결실성 품종육성에 교배친으로 이용될 수 있다. 사과에 있어서 자가결실성 품종의 개발은 인공수분에 따르는 노동력, 경비절감과 더불어 개화기의 기상이변 및 환경오염 등의 불안정한 환경에서도 안정적인 생산을 가능하게 할 수 있다. 또한 이는 앞으로의 사과육종의 소재로 이용될 수 있다.

유전자 발현 억제의 여러 방법 중 본 실험에 이용된 RNAi 기법은 '유전자 knock out 방법' 보다 더 효과적이라 알려져 있다. 과수류에서 국내 처음으로 시도된 RNAi 기술개발은 타과수류 포도, 복숭아 등에서도 gene function을 밝혀내거나, virus 내병성 van종 육종 등 여러 목적에 적용될 수 있다. 또한 형질전환후 mRNA 전사시 목적유전자가 hairpin RNAi 구조를 형성하기 위하여 각 S-RNase 유전자 단편을 sence 방향과 antisence 방향으로 삽입 되게 하고 이들의 중간부분에 애기장대의 intron이 위치하도록 한 pK7GWIWg2(II) vector의 이용은 RNAi를 이용한 고효율 gene silencing에 유용하게 적용될 수 있다.

사과 형질전환시 가장 문제가 되는 낮은 형질전환율 향상에 필요한 요인을 분석한 실험은 앞으로 사과 형질전환에 필요한 주요한 기술로 이용될 수 있다. 공동배양 기간 동안의 ethylene 억제제의 효과적인 처리를 통하여 *Agrobacterium*의 infection율과 신초 재분화율을 높일 수 있어 사과뿐만 아니라 타과수류의 형질전환실험에도 적용할 수 있다. 또한 공동배양 후 *Agrobacterium* 제거에 필요한 항생제의 농도와 종류 및 post selection을 이용한 형질전환율 향상은 형질전환을 통한 분자육종기술로 이용될 수 있다.

따라서 본 연구를 통하여 개발된 RNAi를 이용한 자가화합성 사과 품종 육성의 기술개발은 첫째, RNAi를 통한 자가화합성 'Fuji'형질 전환체는 자가결실성 품종육성에 교배친 혹은 품종으로 이용될 수 있고, 형질전환체는 특허출원을 통한 지식재산권의 확보가 가능할 것이고, 둘째, 형질전환율 향상을 위한 사과의 형질전환기술은 타과수류 등에 적용이 가능하고, 특히 ethylene억제제를 이용한 형질전환율 향상기술은 특허출원이 가능하다. 셋째, hpRNAi를 이용한 gene silencing 기술은 앞으로 유전자 발현억제 실험 등을 위한 기초자료로 유용

하게 활용되어질 수 있을 것이다.

제4협동: 분자마커를 이용한 무·배추의 무사마귀병 저항성 선발마커 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

배추의 뿌리혹병은 토양전염성 병해로서 진정활물기생균인 *Plasmodiophora brassicae*에 의해 발병하며 초기에 뿌리에 이상비대한 혹 모양의 구조를 형성한 후 작물의 생육을 저해하는 것으로 알려져 있다. 처음 일본에서 개발된 유럽순무 (European fodder turnip) 유래의 저항성 품종은 특정한 *P. brassicae* isolate에 대해서만 저항성을 보이고 다른 isolate에 대해서는 이병성을 보이기 때문에, 다양한 isolate에 대해 높은 저항성을 보이는 품종육성이 필요한 실정이다.

뿌리혹병의 어떤 균주에도 감염되지 않는 판별식물 'ECD4' 계통을 이용한 저항성 배추 품종을 육성코자 하는데 고전적인 교배육종을 이용할 수 있지만 이 방법은 시간과 노력이 많이 요구되므로, 이 방법을 이용하면서 육종 효율을 높이기 위한 분자 표지를 개발하고자 하였다.

또한 무에 있어서 자체적으로 개발한 뿌리혹병 저항성원인 '1917' 계통을 이용하여 역시 저항성 유전자와 연관된 분자 표지를 개발코자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 배추에 있어서 뿌리혹병 저항성 유전자원인 'ECD4' 계통에서 저항성 유전자와 연관된 분자 표지를 개발함으로써 저항성 수준이 높고 안정적인 저항성을 가지는 배추 품종을 효율적으로 육성하기 위한 기초연구를 수행하는 것이다. 연구의 세부적인 내용으로는 'ECD4' 계통의 뿌리혹병 저항성의 유전양상을 규명하고, 저항성 유전자와 2cM 이내로 연관된 분자 표지 3개 이상을 개발하여 특허출원 함으로써 국내에서의 배추 뿌리혹병 저항성 품종 육성을 위한 기초 데이터를 제공하고자 하였다. 연구방법으로는 BSA방법을 이용하여 분리집단에서 저항성에 연관된 PCR 산물을 cloning한 후, 염기서열을 분석하여 새로운 PCR primer를 작성하여 효율적으로 저항성 개체를 선발할 수 있는지 검정하고, 이를 유용성이 높은 공우성 SCAR 표지로 전환하였다. 이러한 공우성 SCAR 표지를 이용하여 국내에서 시판되고 있는 배추 품종을 수집하여 분석함으로써 선발 표지로서의 활용 가능성을 검정하였다.

또한 본 연구는 무에 있어서 뿌리혹병 저항성 유전자원인 '1917' 계통에서 저항성 유전자와 연관된 분자 표지를 개발함으로써 저항성 수준이 높고 안정적인 저항성을 보유한 무 품종을 효율적으로 육성하기 위한 기초연구를 수행하는 것이다. 연구의 세부적인 내용으로는 무 '1917' 계통의 뿌리혹병 저항성의 유전양상을 규명하고, 저항성 유전자와 2cM 이내로 연관된 분자 표지 2개 이상을 개발하여 국내에서의 무 뿌리혹병 저항성 품종 육성을 위한 기초 데이터를 제공하고자 하였다. 세부적인 연구방법과 범위는 위의 배추에서와 동일하게 적용하여 수행하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

무의 경우, 저항성과 연관된 6개의 표지를 개발하였으며, 이 중 2개는 공우성 SCAR 표지로, 나머지 4개는 우성 SCAR 표지로 전환하였다. 이들 표지 중에서 저항성유전자와 가

장 가까이 연관된 표지는 CRC18로, 이 표지 유전자형이 'RR'인 경우 평균 발병지수(1 무병 -5 큰 흑)가 1.09, 'Rr'인 경우 2.28, rr인 경우 4.0으로 나타나, 저항성개체를 선발할 수 있는 효율이 아주 높은 것으로 나타났다. 이들 표지를 이용하여 저항성품종 육성을 위해 고정중인 계통에 대해 분석을 한 경우, 실제 저항성수준과 분자표지 유전자형의 상관관계가 아주 높은 것으로 나타났다.

배추의 경우, 뿌리혹병 저항성과 연관된 3개의 표지를 개발하여 공우성 CAPS 표지로 전환하였다. 이들 표지 중에서 저항성유전자와 가장 가까이 연관된 표지는 NCR06으로, 이 표지의 유전자형이 'RR'인 F₂ 53개체의 평균 발병지수는 1.18로 나타났고, 유전자형이 Rr인 F₂ 205개체의 평균 발병지수는 1.26, 유전자형이 rr인 F₂ 72개체의 평균 발병지수는 4.15로 나타나, 저항성개체를 선발할 수 있는 효율이 높은 것으로 나타났다. 이들 분자표지를 이용하여 육성중인 계통이나 일반 시판품종을 분석 한 경우, 실제 저항성수준과 분자표지 유전자형의 상관관계가 아주 높은 것으로 나타나 저항성 품종 육성의 선발표지로 활용될 수 있는 가능성이 아주 높은 것으로 나타났다.

2. 연구개발 결과 활용에 대한 건의

-무와 배추의 뿌리혹병 저항성 유전자의 유전양상을 알 수 있으며, 저항성 유전자와 연관된 분자 표지를 개발함으로써 저항성 개체를 유묘기에 효율적으로 선발할 수 있으며, 이러한 기술을 이용하여 뿌리혹병에 대해서는 저항성을 나타내면서 다른 우수한 형질을 가지는 우수 품종을 상업화 할 수 있을 것으로 판단됨.

- 분자 표지를 이용한 육종 (Marker Assisted Breeding) 기술을 체계화함으로써 이 기술의 이용에 따른 다른 분자 표지 기술의 활성화를 유도할 수 있고, 저항성 유전자와 아주 가까이 연관된 표지를 개발함으로써 저항성 유전자를 분리할 수 있는 기초 자료를 제공할 수 있으며, 이렇게 분리된 저항성 유전자는 형질전환 기술을 이용하여 새로운 저항성 품종을 단기간에 육성할 수 있을 것으로 판단됨.

- 분자 표지를 이용하여 선발함으로써 효율적인 저항성 품종 육성을 통해 육성단가를 절감하고, 나아가서는 경제성 높은 품종을 다량으로 생산할 수 있어 종자산업의 활성화 및 생산비 절감, 고품질 종자생산으로 우리 종자의 대외 경쟁력을 높임으로써 수출 종자에 대한 우위성을 점할 수 있을 뿐 아니라 재배농가의 생산성을 높일 수 있음.

Summary

Exploitation of molecular biological techniques for maximization of traditional breeding efficiency in horticultural crops

1. Establishment of a system for rapid development of cytoplasmic male sterile line multi-resistant to club root and viral diseases and development of molecular markers for viral disease in Chinese cabbage

This study was consisted of mainly two subjects. The first was to introduce rapidly a new cytoplasmic male sterility, that is 'Komatsuna CMS', to inbred lines multiple resistant to club-root and turnip mosaic virus diseases of Chinese cabbage, *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*, with the marker-assisted selection system. The other was develop a selection marker for resistance to virus TuMV-C4 in Chinese cabbage.

No available CMS for Chinese cabbag was not identified among the various *Brassica* CMS such as Ogura of *Raphnus sativus*, Anand of *B. juncea*, and Polima of *B. napus* up to the beginning time of this project. All of them did not present the heterosis in the hybrid. The Komatsuna CMS found recently was strongly suggested to be studied because it was originated from the grafted zone of the scion of Komathuna which is the same species as Chinese cabbage and the cabbage stock. It was expected that there was no faults of CMS's studied previously, such as chlorosis under low temperature and no heterosis in the hybrid.

The first trial was carried out to identify that how many primer pairs for AFLP could be needed in minimum to well-identification of near or remote plants to the recurrent parent(RP). A multiple resistant inbred(doubled haploid line) of B type with the compact head was crossed to unknown line of Komatsuna CMS Chinese cabbage. Ninety F₁ pants were subjected to AFLP with 11 primer pairs with the RP. The order of nearness of them to the RP was determined with every primer pair and every combination with 11 pairs. A combination with certain 4 primer pairs almost identical to the 11 pairs combination in the nearness order in this population. The total polymorphic bands of 4 primer pairs were 325 out of 786 of 11 pairs. Thereafter these 4 primer pairs were generally used for selection of near plants to the RP in the further back cross procedure.

The second trial was to identify the effect of the marker-assisted selection in the back cross system. Although the number of plants was very small in certain generation and population because of the low fertility of CMS lines, a fixed CMS inbred in the B type could be established at the BC₃F₁, which at least 2-3 generations were reduced compared to the traditional selection technique.

The third matter of concern was that the Komatsuna CMS could be available or not for the F₁ hybrid breeding in Chinese cabbage. Most CMS populations derived from the B type line was lowered tremendously in the seed bearing ability from the BC₁F₁ generation and showed the severe chlorosis and no heterosis in F₁ crosses like those of Ogura CMS. Thus an investigation was carried out to clarify that Komatsuna CMS and Ogura CMS are same or not with the primer for orf138 gene of Ogura CMS. Surprisingly Komatsuna CMS presented the specific band of orf138 gene. However, fortunately some other CMS populations of the A type line produced as much seeds as the RP in the BC₂ and BC₃ generations, eventhough they were still segregated in some characteristics because of non selection of the near plants to the RP. In general speaking, Komatsuna CMS is the same as the Ogura CMS. But it could be used for F₁ hybrid breeding without chlorosis and no-heterosis by selecting proper materials before or during back cross.

The final objective of this project was development of a selection marker for TuMV-C4 resistance in Chinese cabbage. An AFLP marker was first selected from the bulked segregant analysis with DH lines derived from an F₁ hybrid made by crossing a resistant line and susceptible inbred. A SCAR marker derived from the AFLP marker was tested with the DH lines and the result was fitted very well. But it was not suitable for the F₂ population. The DNA sequences amplified with the primer was analyzed and identified to be a transposon. So it was considered that this primer could not be used as a selection marker for TuMV-C4 resistance. At the applicable time, A total of 238 SSR primers was released from the National Institute of Agricultural Biotechnology, RDA. They were tested with the same previous materials and 3 co-dominant primer pairs were selected finally. KS-TuMV-3, which was named arbitrarily, out of them was found to be linked most closely to TuMV resistant gene with 2.2 cM and located on the 6th linkage group corresponding to chromosome number 4.

2. Mass-obtaining of low expressional function gene and making of breeding materials using Fox-hunting system in Brassica

Full-length cDNAs are essential for the correct annotation of genomic sequences and for the functional analysis of genes and their products. We have devised a method for efficiently constructing high-content full-length cDNA library based on chemical introduction of a biotin group into the diol residue of the cap structure of *Brassica rapa* mRNA. Full length cDNA selection occurs by trapping the biotin residue at the cap sites using streptavidin-coated magnetic beads, thus eliminating incompletely synthesized cDNAs. With oligo dT column it purify the each mRNA from the flower organs, leaf and stem tissue. First-strand full-length cDNA/mRNA hybrid was captured on magnetic porous glass particles coated with streptavidin. Just before nucleic acid capture, the beads were separated using a magnetic stand and the supernatant was removed by pipetting. And about 120,000 cDNAs from the library were transformed into λ -pFLCIII

-F vector. And about 115,000 cDNAs from the library were transformed into T-DNA binary vector, pBigs for transformation study. The FOX-Agrobacteria library constructed by full length cDNA library of phage DNA. We have developed a novel gain-of-function type gene function specifying method that we have named the FOX (Full-length cDNA Over-eXpressing gene) hunting system as a new type genome scale gene function analysis tool. We used normalized full-length cDNA and introduced each cDNA into Arabidopsis by in planta transformation. Full-length Brassica cDNAs were expressed independently under the CaMV 35S promoter in Arabidopsis. Selfed seeds were yielded of the Arabidopsis transformation by floral-dipping with Agrobacteria. It was selected 300 transgenic plants by hygromycin antibiotics tolerant test, and obtained a number of transgenic mutants. Each transgenic Arabidopsis was monitored under various categories such as morphological changes, fertility and leaf color. We found 27 possible morphological mutants from 300 transformants. After, genomic DNA was extracted from the transgenic mutants. Introduced cDNA was isolated by PCR analysis. Resulting of full sequencing and BLAST searching for introduced cDNA, most of them were complete cDNA and functional genes. Bromelain have been known to be critical factors in plant defense mechanisms such as pineapple, papaya, or wild fig. Bromelain such as papain or ficin show toxic effects to herbivorous insects and pathogenic bacteria. Chinese cabbage (*Brassica rapa*) is one of the main vegetable crops grown in Asia. Soft rot (*Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*) causes severe economic loss in Chinese cabbage as well as in other Brassica crops. In this paper, we examined the effect of Bromelain on enhancing resistance to soft rot in transgenic Chinese cabbage 'Osome'. The Bromelain gene was cloned and transformed into Chinese cabbage using Agrobacterium tumefaciens. Transformants were screened by PCR, then RT-PCR and real time PCR were performed to analyze gene expression of cysteine protease in the T1 and T2 generations. The anti-bacterial activity of Bromelain was tested in Chinese cabbages infected with soft rot bacteria. The results showed that the over-expressed Bromelain gene from pineapple conferred enhanced resistance to soft rot in Chinese cabbage.

3. Characterization and application of fertility-related gene isolated from Arabidopsis male-sterile mutants

Pollen development from sporogenous cells to mature pollen in angiosperm plants requires complex and coordinate gene expression programmes in the haploid gametophytic cells and in the sporophytic tissues. In particular, male gametophyte development involves a large number of genes (approximately 20,000) whose expression is tightly regulated. To date, considerable effort has been focussed on the isolation of pollen-expressed genes which has led to the identification of unique cis-regulatory sequences which control expression from the haploid genome. An alternative to the direct molecular isolation of important pollen-expressed genes is the use of a genetic or

mutational approach. Mutations that interfere with the normal production of male gametophytes or pollen are common and have been described in more than 100 species. The vast majority of these mutations show a sporophytic requirement and are nuclear recessive with only very few showing a gametophytic requirement.

Male-sterility is of particular significance in improving crop yields because of its usefulness in F₁ hybrid seed production. However the basis of the biological and biochemical mechanism of rice male-sterility is not well understood except a few case as a thermosensitive genic male-sterile rice.

Our aim in this study was to isolate and analyze the precise function genes which involved in reproduction process using Arabidopsis male-sterile mutants that was induced by EMS-treatment. Eventually our long-term goal is comprehensive genetic dissection of the molecular mechanisms underlying pollen development and application of pollen gene for the induction of male-sterility in crop.

We isolated two kinds of genes, named *sidecar pollen (scp)* and *geminipollen3 (gem3)*, through map-based cloning approach. The *sidecar pollen (scp)*, the first male gametophytic mutant in Arabidopsis identified by Chen and McCormick (1996), was termed by the mutant pollen phenotype containing an extra vegetative cell. Origin of the extra vegetative cell has been attributed to a symmetrical division that generates two undetermined microspore cells, of which only one of them acquires the ability to polarize towards enough cell fate determinants prior to the asymmetric pollen mitosis I and the other cell differentiates into the vegetative cell by default program. However, since then there have been long standing questions regarding identity of the *SCP* gene and the timing of the symmetric division etc. In fact the defect in *scp* pollen has been often quoted to be premature symmetric division in some literatures, which was one of speculations suggested by the authors (1996). In order to provide better insights for the *SCP* function, we have identified the *SCP* gene by a map-based approach and characterized *scp* mutants.

The combination of recombinant DNA technology and genetic transformation method have provides new possibilities for inducing male sterility. Use of male sterility has been a major focus of crop breeding program using heterosis. Use of MS for hybrid seed production requires availability of three lines: A-line (male-sterile line), B-line (maintainer line) and C-line (restorer line). We have tried the establishment of a simpler and more efficient two-parent hybrid breeding system compared with three-parent system through bio-technological approaches. To generate male sterile crop plant which can be restored by simple treatment in rice field, we designed an experimental procedure by genetic engineering approach using RNAi technology. Using promoters, previously reported as microspore and mature pollen specific gene in Arabidopsis and *Brassica napus*, we constructed four kinds of RNAi gateway binary vectors so that could express a foreign gene pollen-specifically. In order to construct RNAi vectors, we used the Chinese cabbage genes encoding allene oxide synthase (*AOS*) that is catalyze the synthesis of jasmonic acid (JA) that plays an important role in anther development. We

carried out to transform the *B. napus* using *Agrobacterium*-mediated approach.

Based on our knowledge and information obtained through our research, these *scp* and *gem3* genes isolated in the study would be very useful and applicable to control the self-pollination in crop and horticultural species.

4. The study of Self-fertile transgenic apple using S-RNase RNA interfering methods

The main objective of this study was to establish an efficient transformation system for *Agrobacterium*-mediated transformation using RNAi method and to produce transgenic self-fertile 'Fuji' apple. This was achieved by highly efficient RNAi vectors using specific S-RNase sequences and examining regeneration efficiency factors such as treatments of ethylene inhibitor during co-cultivation, different kinds of *Agrobacterium* strains, post-selection or several kinds of antibiotics for eliminating *Agrobacterium*. The results are as follows;

To construct highly efficient RNAi vector, four S-RNases were cloned from 'Fuji'(S₁S₉) and 'Gala' (S₂S₅) and then those fragments were transformed into pK7GWIWg2(II) vector using 'GATEWAY' cassette system. The vector pK7GWIWg2(II) combined the sequences for an intron originated from *Arabidopsis* and inverted sequence of each S-RNase placed under control of CaMV 35S promoter. This vector construct produces double stranded RNA (hairpin RNA) from the inserted sequence of S-RNase fragment, triggering post-transcriptional gene silencing in an efficient way. The insertion was confirmed by PCR and sequence analysis. The effect of ethylene on gene transfer mediated by an *Agrobacterium* harbouring a binary vector with the *b*-glucuronidase (*uid A*) gene was investigated to improve regeneration efficiency. *Agrobacterium* inoculation of explants increased ethylene production, while application of AVG during inoculation reduced it. However the application of AgNO₃ produced more ethylene than control. After 3 days of co-cultivation with *Agrobacterium*, gene transfer in the explants was assayed by transient *uid A* expression. The treatment of AVG resulted high *Agrobacterium* infection rates but the treatment of AgNO₃ did not showed any improvement in infection rate. Under examining the effect of ethylene inhibitor in 'Fuji', the AVG showed highly effective for the efficiency of regeneration. In the experiment of different *Agrobacterium* strains, there was a significant difference in infection rate. The LBA4404 strain gave higher *Agrobacterium* infection rate than the GV3101. In the examining of post-selection on regeneration, shoots were produced on a shooting medium containing kanamycin (50 mg/L). A 2-day incubation period on kanamycin-free medium prior to antibiotic selection enhanced the regeneration rates about 30% of kanamycin-resistant shoots. We also tested the effect of co-cultivation times (48 and 72 hrs) on gene transfer efficiency. No effect on gene transfer efficiency was found by co-cultivation duration (However, the sample sizes were so small. It was required continuous experiments). When different antibiotics were tested for their influence on regeneration, in general the lower rates of antibiotics were the higher regeneration but

the low rate of antibiotics were not completely eliminated *Agrobacterium* growth. The combination of cefortexime (150 mg/L) and clavamax (150 mg/L) or clavamax (250 mg/L), which efficiently controlled *Agrobacterium* growth, also increased regeneration percentage as about 35% in 'Fuji'apple. In vitro leaf explant of 'Fuji' and 'Gala' were inoculated with *Agrobacterium* LBA4404/4 different RNAi vector (S1, S9-RNase hpRNAi for 'Fuji'; S2, S5-RNase hpRNAi for 'Gala'). Explant were then placed on co-cultivation medium with antibiotics. Selection for Km-resistant shoots were carried out in the dark for 4 weeks (2 days kanamycin-free medium prior to antibiotic selection) followed by culture in light. Rooted plants were established in a greenhouse and the intergration of T-DNA into the apple genome was confirmed by PCR. The transformation efficiency of 'Fuji' and 'Gala' apples were about 2.6% and 5.9%, respectively.

5. Development of molecular markers linked to clubroot disease in radish and chinese cabbage

Clubroot disease, caused by *Plasmodiophora brassicae*, is one of the most damaging diseases of vegetable Brassica crops in the world. The resistance to clubroot in Brassica rapa is previously known to be controlled by a major dominant gene and several genes with minor effects on the resistance. To elucidate the genetic nature of the resistance, a segregating F₂ population was obtained by crossing resistant inbred line "NCR1", derived from European turnip, with susceptible inbred line "NRB". Distribution of clubroot incidence by "P. brassicae race 4" in F₂ population did not agree with the segregation pattern of qualitative trait. Bimodal distribution of resistance phenotype in segregating population suggested the presence of two locus with major effect on the resistance. In order to develop clubroot resistant cultivars using marker assisted selection (MAS), we tried to identify resistance locus and DNA markers linked to the locus. We identified three markers linked to resistance loci with major effects using DNA fingerprinting technique combined with bulked segregant analysis. The markers showing low frequency of recombination with the locus in 481 F₂ plants were cloned and sequenced. Those DNA markers were successfully converted into more useful SCAR markers. These SCAR markers will be used efficiently for development of commercial clubroot resistant cultivars in chinese cabbage (*Brassica rapa*).

Genetic background of the resistance to clubroot in *Raphanus sativus* is not well, but radish breeder believe that one major dominant gene and several minor effect genes are contribute to the resistance. To elucidate the genetic nature of the resistance, a segregating F₂ population was obtained by crossing resistant inbred line "1917" with susceptible inbred line "1918". Distribution of clubroot incidence by "P. brassicae race 11" in F₂ population agreed with the segregation pattern similar to qualitative trait. But the presence of moderate resistant plants in F₂ population indicated that another minor genes are also related to the resistance. In order to develop clubroot resistant cultivars using MA), we tried to identify DNA markers linked to the resistance locus using the same methods described above. We developed three SCAR markers linked to the resistance

locus having major effect. These SCAR markers will be used efficiently for development of commercial clubroot resistant cultivars in radish (*Raphanus sativus*).

CONTENTS

| | |
|--|------------|
| SUMMARY ----- | 3 |
| Chapter I. Outline of the research project ----- | 20 |
| Section 1. Necessity of the research | |
| Section 2. Research goals and scope | |
| Chapter II. Present status of domestic and foreign research ----- | 31 |
| Section 1. Present status of research | |
| Section 2. Research results related to international area | |
| Chapter III. Research details and results ----- | 37 |
| Section 1. Establishment of a system for rapid development of cytoplasmic male sterile line multi-resistant to club root and viral diseases and development of molecular markers for viral disease in Chinese cabbage----- | 37 |
| Section 2. Mass-obtaining of low expressional function gene and making of breeding materials using Fox-hunting system in Brassica----- | 102 |
| Section 3. Characterization and application of fertility-related gene isolated from Arabidopsis male-sterile mutants ----- | 251 |
| Section 4. Self-fertile transgenic apple using S-RNase RNA interfering methods---- | 290 |
| Section 5. Development of molecular markers linked to clubroot disease in radish and chinese cabbage 321 | |
| Chapter IV. Accomplishment of research and contribution to the related field ---- | 336 |
| Chapter V. Application plan of the research results ----- | 343 |
| Chapter VI. Foreign research results related to this study ----- | 349 |
| Chapter VII. References ----- | 353 |

목 차

*각 장마다 제3장같이 세부(협동)과제별로 절을 나누어 기술함

| | |
|---|-----|
| 제 1 장 연구개발과제의 개요 ----- | 20 |
| -연구개발의 목적, 필요성 및 범위 | |
| 제 2 장 국내외 기술개발 현황 ----- | 31 |
| *국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내·외 기술개발 현황에서 차지하는 위치 등 기술 | |
| 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 ----- | 37 |
| *이론적, 실험적 접근방법, 연구 내용, 연구결과를 기술 | |
| 제1절 배추 복합내병성 CMS 계통 조기 육성과 그 체계 확립 및 분자표지인자 개발-- | 37 |
| 제2절 Fox-hunting system을 이용한 배추속 작물의 저발현 기능유전자 대량획득 및 육종소재 창성 ----- | 102 |
| 제3절 애기장대 응성불임 변이체를 이용한 임성관련 유전자의 분리 및 이용----- | 251 |
| 제4절 S-RNase 유전자의 RNA interference 방법에 의한 자가화합성 사과계통 육성-- | 290 |
| 제5절 분자마커를 이용한 무·배추 무사마귀병 저항성 선발마커 개발----- | 321 |
| 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ----- | 336 |
| *연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발 목표의 달성도 및 관련분야 의 기술 발전에의 기여도 등을 기술 | |
| 제 5 장 연구개발결과의 활용계획 ----- | 343 |
| * 추가연구의 필요성, 타연구에의 응용, 기업화 추진방안 등을 기술 | |
| * 연구기획사업등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능 | |
| 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ----- | 349 |
| 제 7 장 참고문헌 ----- | 353 |

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 배추 복합내병성 CMS 계통 조기 육성과 그 체계 확립 및 분자표지인자 개발

1. 연구의 필요성

우리나라 배추 품종은 1960년에 시작하여 1970년대 이후에는 거의 완전히 1대잡종으로 바뀌었으며 그것이 오늘에 이르고 있다. 이러한 1대잡종의 경제적 다량 채종은 그 동안에 고도로 발전하여온 자가불화합성의 이용에 전적으로 의존하고 있다. 배추의 자가불화합성은 그 활력이 다른 배추과 식물보다 강할 뿐 아니라 1대잡종 종자 생산에 있어서 자식종자가 거의 생기지 않을 만큼 강하기 때문에 그동안 별다른 문제의식 없이 이용되어 왔다. 그런데 약 10여 년 전부터 배추 1대잡종의 채종을 채종비용이 우리나라의 1/3-1/5밖에 되지 않는 저개발국으로 점차 옮기게 되었다. 이러한 해외 채종의 경우 품종보호제도가 엄격하게 운영되지 않는 국가에서는 품종의 유출을 막을 수가 없음을 알게 되었다. 즉 F1 품종의 양친을 그대로 채종포에서 가져다 증식하여 마치 자기네가 육성한 품종인 양 시판하는 예가 비일비재하게 되었던 것이다.

한편 1대잡종 종자의 경제적 다량 채종체계로서 웅성불임성 이용을 들 수 있는데 웅성불임성에는 핵 내 유전자 웅성불임성(GMS)과 세포질 웅성불임성(CMS)이 있다. GMS는 가끔 배추 류에서도 발견되지만 대부분이 열성 단인자에 의한 웅성불임성으로서 1대잡종 채종에는 거의 이용할 수가 없으며 CMS를 이용한 1대잡종은 아직 보고가 없다. 그런데 무에는 세포질 웅성불임성 인자가 있고 핵내에 그 회복인자가 있는 세포질-핵 유전자 웅성불임성(최근에는 간단히 세포질 웅성불임성(CMS라 함)이 발견되었으며(Ogura, 1968; 정, 1977)우리나라에서는 정이 발견한 이 CMS(Ogura의 것과 동일한 것으로 간주)를 이용하여 1976년에 자가불화합성 대신 웅성불임성을 이용한 1대잡종 무 품종이 발표되었다. 유럽에서는 Ogura가 발견한 무 CMS에 유채 핵을 치환하여 세포질 인자에 의해서만 발현되는 Ogura CMS유채를 개발한 바 있으며 이 CMS 유채에 다시 양배추와 배추 핵을 치환하여 Ogura CMS 양배추와 Ogura CMS 배추가 발표된 바 있다. 이러한 CMS를 이용할 경우 육종조작이 자가불화합성을 이용할 때 보다 훨씬 단순하고 육종비용이 절감될 뿐 아니라 원종 유출에 의한 품종유실을 예방할 수 있는 이점이 있다. 따라서 배추가 주요 작물인 우리나라, 일본, 중국 등에서는 이 Ogura CMS의 배추를 이용하려는 노력을 많이 하였다. 그러나 유채 및 양배추 류 에서와 마찬가지로 온도가 낮을 때 속잎이 노랗게 황화하고 생장이 늦을 뿐 아니라 잡종강세현상이 나타나지 않아 이용할 수가 없었다. 결국 배추의 이용 가능한 다른 웅성불임성을 찾아내거나 유기하려는 노력을 경쟁적으로 기울일 수밖에 없게 되었다.

현재까지 배추과 식물에서 보고되고 있는 CMS는 ① 앞에서 이야기한 무의 Ogura CMS에 배추 핵을 치환한 Ogura CMS, ② Anand가 갖에서 발견한 Anand CMS, ③ 유채 Polima 품종에서 발견된 Polima CMS, ④ 그리고 가장 최근에 발표된 소송채(*Brassica campestris* ssp.) CMS가 있다.

Ogura CMS는 이미 이야기 한 바와 같이 생육 중에 18℃이하의 저온이 되면 속잎에 황화 현상이 나타나고 꽃에는 꿀샘이 없어 벌이 잘 오지 않은 결점이 있었다. 이러한 결점을 제거하기 위하여 코넬 대학의 Earle 등이 원형질체 배양과정을 통해 정상적인 화기구조와

저온 때에 황화현상이 나타나지 않는 Ogura CMS배추를 개발한 바 있다. 그러나 이 CMS를 도입하여 우리나라 배추에 적용한 결과 속잎이 황화하지 않고 정상적인 녹색을 띄지만 F₁에서 잡종강세 현상을 나타내지 않아 이용할 수 없었다고 한다. 갓에서 발견된 Anand CMS와 Polima CMS 역시 배추 핵을 치환하는 과정에 속잎의 황화현상이 나타나거나 혹은 나타나지 않더라도 역시 잡종강세 현상이 나타나지 않아 이용이 불가능할 것으로 판단되고 있다.

따라서 본 과제가 시작될 때까지의 연구 결과로 미루어 볼 때 배추의 1대잡종 종자 생산에 이용 가능할 것으로 기대되는 것은 배추와 종(species)이 같은 소송채 CMS 뿐이라고 생각되었다. 육종과정과 기술을 단순화하여 품종 개발의 국제 경쟁력을 높임과 동시에 신우량 품종의 보호를 위하여 이 소송채 CMS를 활용하기 위한 집중적인 연구가 절실한 시점이라고 할 수 있을 것 같았다.

용성불임성을 이용한 F₁을 육성하더라도 그 품종이 배추에서 가장 큰 문제로 되고 있는 바이러스병, 뿌리혹병, 무름병 등 3대 병해에 복합내병성을 갖지 않으면 널리 보급되거나 해외로의 종자수출이 불가능하다. 뿐만 아니라 1대 잡종은 서로 형질의 차이가 큰 양친 간 교잡일 때 잡종강세가 크게 나타나는 것이므로 양친을 구분하여 여러 개의 CMS계통을 육성하지 않으면 육성된 CMS 계통을 F₁ 품종 육성에 곧바로 이용할 수가 없다.

그런데 용성불임성이나 내병성 등 특정 인자를 도입코자할 경우 흔히 여교잡 육종법을 이용한다. 이 육종법은 계통육종법보다 고정연한(세대수)이 짧은 장점이 있다. 그리고 분자생물학적 marker를 이용하여 선발하면 여교잡 세대를 더욱 줄일 수 있다. 즉 실용상 지장이 없을 정도의 고정을 위하여 여교잡 세대를 BC₄F₁-BC₆F₁정도까지 진행시켜야 하는데 분자 marker로 강선발을 겸하면 BC₂F₁ 정도에서도 충분한 고정 계통을 얻을 수 있다고 생각된다.

2. 연구 목적

소송채 CMS에 뿌리혹병과 TuMV에 복합저항성인 배추를 핵치환하여 복합내병성 CMS 배추를 육성한다. 육성방법은 지금까지 시도되지 않았던 DNA marker를 이용함으로써 형질 고정을 위한 세대를 BC₄F₁-BC₆F₁에서 BC₂F₁-BC₃F₁으로 크게 단축시킨다. F₁ 품종에서의 잡종강세 현상이 크게 나타나기 위해서는 서로 형질이 크게 다른 A형과 B형 순계간 교잡이 여야 하므로 복합내병성 CMS계통을 A형과 B형의 순계 각각마다 육성하여 다양한 F₁ 품종 육성 재료를 확보한다. 내병성 개체(계통)의 선발 효율을 높이기 위하여 DNA marker가 필요한데 뿌리혹병에 대하여는 이미 SCAR marker가 발표된 바 있지만 TuMV에 대한 것은 아직 없으므로 이의 SCAR marker를 개발한다. 최종적으로 CMS를 이용한 우량 1대잡종을 육성하여 소송채 CMS를 이용한 1대잡종육성 체계를 확립코자하였다.

3. 연구의 범위

소송채 CMS에 내병성이 없는 배추 계통을 2회 교잡한 것을 기본 CMS의 재료(공여친)로 이용하고 뿌리혹병과 TuMV 및 무름병의 3대병 복합내병성 순계(DH line)를 반복친으로 하여 여교잡한다. 여교잡 과정에 복합내병성 주를 DNA marker로 검정하여 반복친에 가장 가까운 개체를 강선발함으로써 적어도 BC₃F₁에서 고정된 계통을 얻도록 한다.

한편 기 보존중인 DH 계통 또는 BC₁F₁을 이용하여 배추 바이러스병 TuMV-C4의 내병성 개체 선발용 분자표지인자를 개발한다.

제2절 Fox-hunting system을 이용한 배추속 작물의 저발현 기능유전자 대량획득 및 육종소재 창성

1. 연구개발의 목적 및 중요성

미래학자들은 21세기 국부의 척도를 유전자원의 양과 질에 의하여 결정될 것으로 전망하고 있는바, 상품가치(market value)가 있는 유전자원의 수집 및 활용을 통한 신작물과 신품종의 개발 없이는 선진농업 진입에 한계가 있을 것이다. 국제적으로는 생물다양성협약이 발효되고, 식물유전자원 국제규약 개정안을 마련 중이나, 자원보유국(주로 개도국)과 자원이용국(주로 선진국)간 이해가 상충되고, 이에 따라 국제적인 갈등을 겪기도 하고 있다. 최근 WTO/TRIPs 규정, UPOV 협약 등이 이루어지면서 육종선진국들은 신품종보호 등록 후 로열티를 요구하며, 한국에서도 이러한 문제가 심각한 이슈가 되고 있다.

이러한 상황 가운데, 고추, 배추, 무 등의 채소 작물을 대상으로 한 한국의 육종 기술 수준은 세계 최고로 평가받아 왔다. 그러나 최근의 국제현황을 살펴보면 분자유종(분자마커를 이용한 품종 개발 및 형질전환체 개발)에 의한 고품질 신품종의 출현이 등장하면서 국내 종자 및 채소 시장에 상당한 영향을 미치기 시작했고 이에 대한 국가 차원의 경쟁력을 위해 국내 육종 기술 체계의 패러다임이 매우 절실한 상황에 이르렀다. 따라서 한국이 지속적으로 종자강국을 유지하기 위해서는 전통육종방식에 분자유종체계를 접목시키고 이를 발전시키는 것이 필요하다.

2. 기술적 측면의 필요성

유전자의 기능을 해석하여 분리해 내는 방법으로서 점 돌연변이 유도, EST를 이용한 micro-array법, 유전자 Tagging법 등이 이용되고 있다. 이들은 모두 서로 다른 장점과 단점을 가지고 있다. 유전자의 점 돌연변이 유도법은 변이의 유도가 간단한 반면 게놈 DNA를 구성하는 수억개의 염기 배열 중에서 돌연변이를 나타나게 한 하나의 염기 치환을 검색해 내야 하므로 많은 시간과 기술이 요구되는 단점이 있다. DNA칩을 이용하는 micro-array법은 cDNA를 이용하기 때문에 기능유전자를 가져내는 좋은 방법으로 이용되고 있다. 그러나 칩에 내장된 cDNA가 유전자의 Full length가 아닌 일부 단편만인 것이 많기 때문에 기능이 있는 유전자를 검색하는데에 한계가 있다는 결점이 있다. 유전자 Tagging법은 Tag로서 T-DNA 또는 transposon을 무작위로 게놈 중에 삽입시키는데 이러한 Tag가 삽입된 유전자는 그 기능이 파괴되기 때문에 어떤 기능의 유전자가 Tagging되었는지 알 수가 있다. 그러나 이 방법은 Tag element가 삽입된 유전자가 over expression 되거나, 여러 가지 많은 유전자에 한꺼번에 삽입되어 형질 발현 유전자 또는 기능이 파괴된 유전자와 Tag element가 삽입된 유전자와의 관계가 모호한 경우가 많다는 것이다. 이러한 문제점을 해결하고 유용유전자를 다량으로 확실하게 얻을 수 있는 한 방법이 최근에 개발되고 있다. 식물의 각 기관으로부터 mRNA를 추출하고 이를 바탕으로 새로이 개발된 기술을 이용하여 full length cDNA를 다량으로 작성한 후 모든 DNA의 염기서열이 밝혀진 애기 장대에 형질전환시킨다. 그리고 애기 장대에서 나타난 변이체를 이용하여 그 관련 유전자를 분리해낸 후 다시 본래의 식물에 형질전환하여 그 유전자의 기능을 확인하는 방법인데 이를 "Full length cDNA를 이용한 종합적 유전자 기능 해석의 식물 시스템"이라고 한다. 이 방법은 (1) 발현조절배열을 포함하는 완전장 cDNA의 library를 작성하여 이

를 식물에 도입하고, (2) cDNA가 도입된 식물집단에서 목적의 선발조건에 적합한 식물체를 선발하고, (3) 선발된 식물체로부터 cDNA를 단리하고, (4) 단리된 cDNA를 도입된 식물체와 동종의 식물체에 재도입하여 선발조건에 따른 표현형질을 재확인하는 것이다. 완전장 cDNA library는 유전자가 기능할 때에 필요한 전아미노산 정보를 포함하기 때문에 도입하는 유전자가 본래 갖고 있는 전기능을 발휘할 수가 있다. 따라서 통상의 cDNA library와 비교하면 기능발현의 효율이 훨씬 높고, 또한 모든 cDNA 단편이 본래의 개시코돈 및 정지코돈 정보를 갖추고 있기 때문에 발현을 위한 단백질 융합화 등의 필요가 없이 단백질 발현효율이 높다. 이 system은 sense mRNA를 발현시키거나(단백질 과잉 또는 감소 발현) antisense mRNA를 발현시켜(통상 단백질의 발현량 감소) 특정 형질의 표현형이 나타날 경우 모두 우성 또는 반우성의 표현형질로서 나타나게 된다. Cloning된 생식 관련 기능유전자는 형질전환용 donor gene으로 활용하여 신기능성 작물의 창출에 이용된다. Full-length cDNA는 promoter 분석, 발현 및 기능해석과 식물단백질의 구조분석을 위하여 필요하며, 따라서 이 system을 도입하여 배추과 작물의 생식기관에서 발현하는 유전자(full-length cDNA)를 대량으로 확보할 수가 있다.

3. 경제·산업적 측면의 필요성

배추는 *Brassica rapa*의 아종으로, 경제적으로, 식물 유전학적으로 매우 중요한 가치를 지니고 있다. 배추는 애기장대라는 식물체(모양과 크기가 꽃다지와 유사)와 약 1700만 년 전에 분화되었으며, 약 1500만 년 전에 한 세포내에 동일한 염색체를 3쌍이나 갖는 6배체 식물이 되었다. 배추와 같은 조상에서 분화된 애기장대는 아직도 꽃다지와 비슷한 야생의 작은 잡초로 머문 반면, 배추 유전체는 6배체가 된 후 1500만년 동안 안정적인 이배체 구조로 변화하였고 애기장대와 비교할 수 없을 정도로 큰 식물체로 진화하여 우리의 식단에서 빼 놓을 수 없는 중요한 채소가 되었다. 따라서 두 식물체에서의 유전자와 발현 조절 변화 연구는 배추뿐 아니라 다른 작물의 진화기작에 대한 새로운 이해는 물론 생명공학을 통한 우수한 농작물 개발에도 크게 활용될 것으로 기대된다.

4. 사회·문화적 측면의 필요성

배추가 우리나라에 도입된 시기는 분명하지 않으나 중국과 일본이 도입 시기를 각각 2,400년 전과 1,250년 전으로 추정하고 있으므로 보아 우리나라는 지정학적으로 보아서 기원 전에 도입되었을 것으로 추정되어 지고 있다. 또한 무의 영양소는 비타민 A는 없지만 비타민 C는 44mg이나 들어있으며 칼슘이 62mg, 인이 29mg 들어있다. 또한 배추, 무 등은 알칼리성 식품으로 체액을 알칼리성으로 유지시키는 역할을 한다. 이러한 영양가를 가지는 배추는 무와 더불어 김치의 주재료로써 우리의 식생활에 매우 중요한 위치를 차지하고 있다. 현재, 김치는 국제규격을 획득하여 수출이 확대되고 있어 더욱 더 품질을 다양화하고 고급화할 필요성이 요구되어지므로 김치 중주국의 위치를 고수하기 위해서도 그 주재료가 되는 배추에 대한 기초적, 체계적인 연구가 필요하다.

5. 연구개발의 범위 및 내용

| 구 분 | 연구 개발 목표 | 연구개발 내용 및 범위 |
|------------------|---|--|
| 1차년도 (2004) | 균질화된 완전장 cDNA 및 FOX-Agrobacterium library 작제 | <ul style="list-style-type: none"> - RNA 조제 및 cDNA 합성 - cDNA의 5'말단 염기배열 결정 - 작제 library의 검토 - Linker ligation 및 PCR에 의한 증폭 - FOX Agrobacteria library의 작제 |
| 2차년도 (2005) | 완전장 cDNA의 염기서열 분석 및 유용유전자의 Genbank 등록 | <ul style="list-style-type: none"> - cDNA의 5' 및 3'말단의 염기서열 결정 - 완전장 cDNA를 염기서열 분석 및 유용 유전자(스트레스 저항성 관련) 등록 |
| 3차년도 (2006) | FOX-Agrobacterium library를 이용한 애기장대의 변이체 선발 및 유전자 기능 해석 | <ul style="list-style-type: none"> - Dipping법에 의해 Arabidopsis에 형질전환 - 자식종자 획득 - 형질 변이체 선발 및 T2 종자 획득 - 변이체로부터 분리된 기능유전자 GenBank 등록 |
| 4차년도 (2007) | 배추의 완전장 cDNA library로부터 ABC transpoter 유전자 분리 및 분자적 특성 | <ul style="list-style-type: none"> - ABC 수송체의 염기서열 분석 및 BlastX 분석 - 아미노산 배열 상동성 비교 및 계통 분석 - Southern blot 및 RT-PCR 분석 |
| 5차년도 (2008) | 배추의 완전장 cDNA library로부터 Bromelain 유전자 분리 및 형질전환 | <ul style="list-style-type: none"> - Bromelain 유전자 cloning - 식물 발현백터의 구축 - 'Osome' 형질전환체의 작성 - 무름병균 접종 및 발병율 |

제3절 애기장대 응성불임 변이체를 이용한 임성관련 유전자의 분리 및 이용

1. 연구개발의 목적 및 필요성

화분 발달과정은 응성배우자를 만드는 식물의 생식세대에 속하며 비교적 짧은 주기이나 종자식물의 존재여부에 근간이 되는 중요한 생물학적 과정인 동시에 농업분야에 그 응용가능성 또한 크다.

속씨식물의 화분발달의 개략적 과정은 다음과 같이 요약될 수 있다. 약(anther) 안에 형성된 2배체인 화분 모세포(PMC: pollen mother cell)가 한 번의 감수분열과 두 번의 유사분열을 거치게 된다. 감수분열 후 4개의 반수체인 소포자 4분체(microspore tetrad)가 형성되고, 이후 칼로스 분해에 의해 유리 되어 나온 소포자(microspore)의 핵은 화분 생식극(generative pole)으로 이동한다. 극화된 소포자(polarised microspore)는 비대칭성 소포자분열인 제1 화분 유사분열(pollen mitosis I)을 통하여 전혀 다른 세포 특성을 가진 영양세포(vegetative cell)와 생식세포(generative cell)가 된다. 영양세포는 대부분의 세포질과 세포내

소기관을 포함하며, 핵은 덜 응축되어 있다. 이에 반해, 생식세포는 매우 제한된 세포질과 세포내 소기관을 포함하며, 그 핵은 매우 응축되어 있다. 이후 생식세포를 둘러싼 칼로스가 분해되면서 생식세포가 영양세포의 세포질 안으로 이동하여 '세포안의 세포 (cell-within-a cell)'구조의 중기 2-세포성 화분(mid-bicellular pollen)이 된다. 영양세포는 더 이상의 세포 분열능이 없는 대신, 정세포(sperm cell)를 자성배우자로 이동시키는 화분관을 만드는 기능을 하는 반면, 생식세포는 제2 화분유사분열(pollen mitosis II)을 거치면서 2개의 정세포를 만들어 최종적으로 3-세포성 화분(tricellular pollen)이 된다.

화분발달과정에 따른 형태와 내부구조에 관한 연구는 주로 분류학적인 방법과 전자현미경적 방법으로 자세히 이루어져 있는 반면, 화분 특이적 유전자의 연구는 전 세계적으로 아직 시작단계에 있다. 최근 급속도로 발전하고 있는 분자생물학적인 기술의 발달에 힘입어, 모델 식물인 애기장대를 비롯한 다양한 종의 게놈 프로젝트들이 완료되었으며, 방대한 수의 돌연변이체 pool, microarray 데이터와 같은 유전자발현 정보 등 각종 유용한 데이터베이스 구축되어 웅성배우자 특이적 유전자에 관한 연구도 앞으로 많은 진전이 이루어 졌다. 속씨식물의 포자형성세포로부터 유래하는 성숙화분의 발달과정은 반수체인 배우체 세포와 포자체 조직에서 매우 복잡하고 정교한 유전자 발현 프로그램을 필요로 한다. 특히 웅성배우체의 발달과정에는 정밀하게 발현이 조절되는 수많은 유전자(약 20000개 이상)들이 관여한다. 지금까지 화분에서 발현하는 유전자를 분리하기 위하여 많은 연구자들이 노력해왔는데, 이러한 연구를 통하여 반수체 게놈의 유전자 발현을 조절하는 cis-조절인자를 발견할 수 있을 것으로 생각된다. 화분에서 발현하는 유전자를 직접적으로 분리 동정하기 위한 또 하나의 접근 방법으로 돌연변이체를 이용한 유전학적인 접근방법을 들 수 있다. 지금까지 웅성배우체 혹은 화분의 정상적인 생산을 방해하는 돌연변이들은 100여종 이상에서 보고되었다. 이들 돌연변이체의 대부분이 포자체의 정상적인 형성에도 필요할 뿐 아니라, 유전자적 열성변이이며, 일부는 배우체의 발육에 필요한 유전자들의 변이에 의해 유발된 것이다.

웅성불임성은 F₁잡종종자생산에 있어서 유용성 때문에 작물의 생산성의 증대를 위해 특히 유용하다. 많은 작물에서 웅성불임성을 유발하는 다양한 기작들이 알려져 있다. 주곡작물인 벼의 웅성불임성의 생물학적 생화학적 기작에 관해서는 온도 및 일장에 감응하는 환경감응성 웅성불임성 변이들이 알려져 있다.

본 연구를 수행한 주요한 목적은 모델식물 애기장대를 대상으로 농업적으로 활용·가능한 임성관련 유전자를 2종 이상 탐색 분리하여 원천기술 및 재료를 확보하는 것이다. 또한 여러 가지 최신의 분자생물학적 연구방법을 이용하여 이들 분리된 유전자들의 생물학적 기능을 정확하게 이해·분석하는 것이다. 궁극적으로 연구의 장기적인 목표는 식물의 화분발달에 관여하는 유전자들의 분자세포수준의 기작을 정확하게 이해하고, 이들을 이용하여 작물의 웅성불임성을 인위적으로 유발하기위한 기초적 토대를 마련하는 것이다.

제4절 S-RNase 유전자의 RNA interference 방법에 의한 자가 화합성 사과 계통 육성

1. 연구개발의 목적 및 필요성

자식(selfing)을 방어하기 위하여 동종의 화분으로부터 자기 개체 유래의 화분을 식별해서 수정시키지 않는 유전적 형질 중 가장 고도의 기구가 자가불화합성(self-incompatibility, SI)이다. 이는 Gametophytic과 Sporophytic SI로 구분된다(de Nettancourt, 1977). 과실류에 있어서 사과, 배, 양앵두 등은 자가불화합성(Gametophytic SI)의 대표적인 것으로 성공적인 수분, 수정과 결실을 위해서는 수분수의 혼식이 필수불가결하다. 사과와 많은 다른 종에서 작용하는 자가불화합성(GSI) 현상은 S 유전자좌에 복대립 유전자가 존재하는 것으로 알려져 있다(Frankel & Galun, 1977). 환경오염 및 기상악화 등의 요인으로 인하여 꽃가루 매개곤충의 활동 약화 등으로 수정, 착과율이 감소하며 당해연도 개화시기의 기상조건에 따라서 착과율이 달라지므로 안정적인 사과 생산에 위협적인 요소로 대두되고 있다. 이를 극복하기 위하여 인공수분을 실행하므로 생산비를 높이는 요인이 되고 있다.

근래에 분자생물학의 기술을 이용하여 자가불화합성(Gametophytic SI)의 기작이 밝혀지고 있으며, 자성측의 원인으로서는 style에서 발현하는 ribonucleases의 일종인 self-incompatibility ribonucleases (S-RNases) 임이 가지과(Anderson et al., 1986; McClure et al., 1986)와 장미과(Broothaerts et al., 1995; Janssens et al., 1995; Sassa et al., 1992; Tao et al., 1997) 밝혀졌고, 이는 자가 화분 관의 RNA를 분해함으로써 자식을 방어하는 것으로 알려졌다. 사과의 옹성측 자가불화합성 유전자는 아직 자세히 밝혀지지 않은 상태이다. PCR 및 염기서열 분석을 통하여 빠른 시간내에 정확한 자가불화합성 유전자형을 알아내는 여러 실험들이 되어왔다. 지금까지 사과에서는 여러 개의 S-RNase가 cloning 되어 염기서열이 결정되었다 (Boskovic & Tobutt, 1999; Verdoodt et al., 1998; Van Nerum et al., 2001; Sakurai et al., 1997; Matsumoto와 Kitahara, 2000).

동양배의 경우 자가화합성 품종인 오사이십세기(S4sm; 자가화합 S-allele)를 이용하여 자가결실성 품종을 육성하고 있으며, 양앵두의 경우에도 자가화합 선발계인 JI 2420 (S4'; 자가화합 S-allele; 'Emperor Francis' X 'Napoleon' pollen X-irradiation)을 이용하여 여러 자가화합성 양앵두가 개발되고 있다(Lapins, 1971). 사과품종에는 자가결실성 품종육성에 교배친으로 사용할 자가화합성 계통/품종이 절실 히 요구되고 있으나 현재로는 없는 실정이다.

유전자 발현 억제의 여러 방법 중 최근에는 RNAi가 '유전자 knock out 방법' 보다 더 효과적이라 알려져 있고(Holen et al., 2003), 여러 동식물에서 gene function을 밝혀내는 등 여러 목적으로 활용되고 있다. RNAi는 dsRNA를 식물체에 주입했을 때, 상보적인 세포 내부의 mRNA와 특이적으로 결합하여 유전자 발현 억제를 유도할 수 있는 방법이다. 과수류에서의 RNAi방법을 이용한 목적유전자의 gene silencing의 기술 개발이 요구된다.

식물체의 형질전환에서 형질전환율은 다음 3단계들에서 결정되어진다. 형질전환율에 미치는 주요 단계; I. gene transfer to expanct cells, II. selection of transformed cells, III. plant regeneration from transformed cells(Bolar et al., 1998). 이들 중에서 ethylene에 관련된 단계로는 step I, 과 III 로써 식물체에 따라 혹은 식물체의 품종에 따라 달라 질수 있다고 알려져 있다(Kung & Wu, 1993). Step I 시기의 ethylene은 식물체의 상처로부터 발생되는 것으로 알려져 있으며, ethylene은 plant-microbe interaction에 영향을 미치므로 접종효율에 영향을 미칠 것으로 고려된다. 그리고 step 3에서의 ethylene의 영향은 아마 shoot와 tumour의 발생에 연관이 있을 것으로 추정되고 있다(Goh et al., 1997). 또한 사과 및 많은 과수류에서는 *Agrobacterium tumerfaciens*나 *A. rhizogenes* 등이 형질전환용으로 이용되어왔다. *A. tumerfaciens*의 strain 중에서 EHA105, GV3301, LBA4404등이 과수류의

형질전환에 널리 이용되고 그 효율은 과종 및 genotype에 다르다고 알려져 있다(Hellens et al., 2000; Song & Sink, 2004). 높은 재분화의 효율성을 위하여 딸기류등에서는 공동배양 후 10일 동안은 제초제를 첨가 하지 않은 배지에서 배양 후 선발을 하는 post selection (or delayed selection) 방법을 이용하는 것이 매우 중요하다고 보고되었다. 공동배양 후 선발배지에서의 다양한 종류의 항생제들은 남아있는 *Agrobacterium*을 제거하기 위해 사용되어져 왔다. 하지만 이들의 종류와 농도에 따라서 재분화 효율이 달라진다고 알려져 있다 (Alsheikh et al., 2001; Horsch et al., 1985; Cevera et al., 1998). 사과의 형질전환 시 Ethylene 억제제의 이용, *Agrobacterium tumerfaciens*의 strain, post-selection 및 항생제의 농도 및 종류들이 형질전환을 향상에 어떠한 영향을 미치는지 구명하는 것이 요구된다.

따라서 본 연구에서는 우리나라 사과의 주품종인 'Fuji' (S₁S₉)에 S-alleles의 RNAi법을 이용하여 자가결실성인 'Fuji' 사과품종이 개발 하고자 한다. 또한 사과 형질전환 시 형질전환을 향상에 필요한 요인을 분석 하여, 앞으로 효과적인 형질전환기술을 개발하고자 한다. 사과에 있어서 자가결실성 품종의 개발은 인공수분에 따르는 노동력, 경비절감과 더불어 안정적인 생산을 가능하게 할 수 있다. 또한 이는 앞으로의 사과육종의 소재로 이용될 수 있다.

2. 연구범위

우리나라 사과의 주품종인 'Fuji' (S₁S₉)에 S-alleles의 RNAi법을 이용하여 자가결실성인 'Fuji'를 개발하기 위하여, 사과의 주두에서 발현하는 S₁- 및 S₉-RNase를 cloning하여 염기서열을 분석하고 pK7GWIWg2(II) vector를 이용하여, PCR 만으로 목적 하는 유전자인 S-RNase를 vector에 삽입하고 intron을 이용한 intron hairpin RNA(ihRNA)를 형성하게 함으로써 효율적인 gene silencing이 일어날 수 있도록 vector를 구축 확인 한다. 또한 비교품종인 'Gala'도 'Fuji'와 같은 동일한 방법을 이용하여 S-RNase의 cloning과 RNAi vector를 구축한다.. 형질전환 실험을 위하여 공시재료를 기내도입, 유지 증식하며, 이를 이용하여 사과의 형질전환 시 Ethylene 억제제의 이용, *Agrobacterium tumerfaciens*의 strain, post-selection 및 항생제의 농도 및 종류들이 형질전환을 향상에 어떠한 영향을 미치는지 구명한다. *Agrobacterium* 매개법에 의해 주 공시재료인 'Fuji'와 비교품종인 'Gala'에 제작된 RNAi vector 도입, 선발 및 순화 후 형질전환체를 분석 육성하도록 한다.

가. 고효율적 S-RNase gene silencing을 위한 RNAi vector 구축

고효율적인 RNAi vector를 구축하기 위하여, 먼저 'Fuji'와 'Gala'Fuji'의 S-RNase 유전자를 cloning하기 위하여 경북대학교 균위실습 포장에 재식되어 있는 두 품종의 풍선기 상태의 꽃을 채집한 후 암술을 분리하여 total RNA 와 RT-PCR을 실시하였다. 각 품종의 S-allele specific primer와 cDNA를 이용하여 'Fuji'에서 S₁-, S₉-RNase 'Gala'에서 S₂-, S₅-RNase를 Cloning 한다. 이들을 sequence 한 후 염기서열을 비교 분석한다. pK7GWIWg2(II) vector를 이용하여, PCR 만으로 목적하는 유전자인 4종의 S-RNase를 vector에 삽입하고 intron을 이용한 intron hairpin RNA(ihRNA)를 형성하게 함으로써 효율적인 gene silencing이 일어날 수 있도록 4종의 vector를 구축하고 각 vector의 sense와 antisense의 일부분을 증폭하고 sequence후 삽입여부를 확인 한다.

나. 사과에서의 형질전환효율성 향상을 위한 요인 분석

식물체의 형질전환에서 형질전환율은 다음 3단계들에서 결정되어진다. 형질전환율에 미치는 주요 단계; I. gene transfer to explant cells, II. selection of transformed cells, III. plant regeneration from transformed cells(Bolar et al., 1998). 형질전환 효율에 미치는 요인들을 구명하기 위하여 공시재료를 기내도입, 유지 증식하며, 이를 이용하여 사과의 형질전환 시 Ethylene 억제제의 이용, *Agrobacterium tumerfaciens*의 strain, post-selection 및 항생제의 농도 및 종류들이 형질전환율 향상에 어떠한 영향을 미치는지 구명하고자 한다. 공동 배양 기간 중 Ethylene 억제제인 Aminoethoxyvinylglycin (AVG) 과 silver nitrate (AgNO_3)의 처리가 *Agrobacterium* 접종효율과 신초 재분화율에 미치는 영향을 조사하였다. *Agrobacterium* 접종효율은 공동배양 3일후 GUS transient expression 통하여 실행하였다. 신초 재분화율은 선발 신초 증식배지에 이식, 4-6주후 건강한 meristem의 발생정도를 분석하였다. Ethylene억제제가 *Agrobacterium* 접종효율과 신초재분화율에 미치는 영향을 규명하기위하여 공동 배양시 억제제첨가 후 ethylene발생량을 측정하였다. *Agrobacterium* 접종효율에 미치는 영향을 고찰하기 위하여 억제제 첨가 후 24h 의 간격으로 3일 동안, 그리고 신초 재분화율을 위해서는 재분화유도 배양시작부터 1주일간격으로 4주일동안 ethylene 발생량을 측정하였다. 또한 *Agrobacterim* strain, 공동배양기간, post (delayed selection) 및 항생제 종류 및 농도에 따른 접종효율 및 재분화율을 조사하여 'Fuji' 및 'Gala'에 가장 적합한 형질전환 조건을 규명하도록 한다.

다. *Agrobacterium* 매개법에 의해 'Fuji' 사과에 RNAi vector 도입 및 분석

형질전환을 위한 기본식물체 유지 및 증식을 위하여 신초의 정단부분 1cm 정도를 잎을 모두 제거하여 Murashige and Skoog(이하 MS)배지에 치상하고, 증식된 신초에서 잎이 3~4장 전개 되었을 때(약 4~6주후) 정단부분을 실험 재료로 사용한다. 자가 불화합성 타과를 위한 형질전환에 이용될 4종의 vector (S_1 , S_9 -RNase hpRNAi for 'Fuji'; S_2 , S_5 -RNase hpRNAi for 'Gala')는 *Agrobacterium* LBA 4404에 형질전환하여 식물체의 형질전환용 strain을 제작한다. LBA 4404의 접종, 공동배양 및 선발배양은 기존의 방법과 본 실험에서 구명된 방법 등을 이용한다. *Agrobacterium* 매개법에 의해 S-RNase RNAi 유전자가 도입된 형질전환체는 PCR등을 통해 분석 및 육성한다.

제5절 분자마커를 이용한 무·배추 무사마귀병 저항성 선발마커 개발

1. 연구개발의 목적

본 연구는 무와 배추에서 뿌리혹병 저항성 유전자와 연관된 분자표지를 개발하고, 이를 육성의 선발표지로 활용함으로써 육성의 효율을 높이기 위해 수행되었다. 배추에 있어서 뿌리혹병 저항성원인 'ECD4' 유래 계통에서 저항성 유전자와 연관된 분자 표지를 개발함으로써 저항성 수준이 높고 안정적인 저항성을 갖는 배추 품종을 효율적으로 육성하기 위한 기초연구를 수행하고자 한다. 무에 있어서는 뿌리혹병 저항성원인 '1917' 계통에서 저항성 유전자와 연관된 분자 표지를 개발함으로써 저항성 수준이 높고 안정적인 저항성을 갖

는 무 품종을 효율적으로 육성하기 위한 기초연구를 수행하고자 한다. 이러한 목표를 위해 개발된 무와 배추의 뿌리혹병 저항성 연관 분자표지를 실용화하여 경쟁력 높은 우수품종을 효율적으로 육성할 수 있는 시스템을 구축하고자 한다.

2. 연구개발의 필요성

- 뿌리혹병은 한국과 일본에 있어서 배추과작물의 수확량을 감소시키는 주요 병으로 알려져 있으며, 토양전염성 병해로서 진정활물기생균인 *Plasmodiophora brassicae*에 의해 발병하며 초기에 뿌리에 이상비대한 혹 모양의 구조를 형성한 후 작물의 생육을 저해하는 것으로 알려져 있음.

- 뿌리혹병은 진정활물기생균에 의해 발병이 일어나기 때문에 발병기작이나 저항성계통에서의 저항성 기작에 대한 연구는 전무한 실정임.

- 유럽순무 (European fodder turnip)를 이용하여 육성한 저항성 배추품종의 경우 특정한 *P. brassicae* isolate에 대해서만 저항성을 보이고 다른 isolate에 대해서는 이병성을 보이기 때문에, 다양한 isolate에 대해 높은 저항성을 보이는 품종육성은 현재 전무한 실정임.

- 최근에는 유럽순무 (European fodder turnip) 중에서 뿌리혹병 병원균의 병원성검정을 위한 differential host로 이용되는 'ECD4' 계통은 *P. brassicae* isolate에 대해서도 높은 저항성을 보이는 것으로 보고되고 있으므로, 이 계통을 이용한 배추 저항성품종 육성이 절실히 요구되는 실정임.

- 'ECD4' 계통을 이용한 저항성 배추 품종을 육성하기 위해서는 고전적인 교배육종을 이용할 수 있지만 이 방법은 시간과 노력이 많이 요구되므로, 이 방법을 이용하면서 육종 효율을 높이기 위해서는 저항성 유전자와 연관된 분자 표지를 개발하는 것이 절실히 요구되므로 'ECD4' 계통에서 뿌리혹병의 저항성 유전자와 연관된 분자표지를 개발하고자 함.

- 현재 재배되고 있는 뿌리혹병 저항성 배추품종의 경우, 특정한 *P. brassicae* isolate에 대해서만 저항성을 보이고 다른 isolate에 대해서는 이병성을 보이기 때문에, 병원균의 돌연변이 또는 새로운 병원균의 출현 등이 배추 생산량의 주요감소 요인으로 작용할 수 있으며 배추와 채소종자 시장의 불안정을 초래할 수 있음.

- 무의 경우는 현재로서는 뿌리혹병이 무의 생산량 저하에 큰 영향을 미치지 않고 있으며, 배추와는 다르게 뿌리혹병에 저항성을 보이는 계통들이 국내에도 많이 존재하고 있으므로 크게 문제는 되지 않는 실정임.

- 뿌리혹병 병원균은 진정활물기생균이기 때문에 병원성의 변이가 아주 다양하고 병원균의 돌연변이율도 아주 높아 머지않은 장래에 무에서도 큰 문제를 일으킬 가능성이 높은 것으로 예측되므로 다양한 종류의 저항성 품종육성이 시급히 요구됨.

- 무와 배추 생산의 안정성 유지를 위해서는 이들 작물의 주요 생산량 감소 요인으로 작용할 수 있는 뿌리혹병에 대해 저항성 수준이 높고, 다양한 isolate에 대해서 안정적인 저항성을 보유하는 품종육성이 절실하게 요구되므로, 이러한 품종육성을 위해 저항성계통을 정확하고 효율적으로 선발할 수 있는 분자표지를 개발하는 것이 필요함.

- 본 연구는 무와 배추의 자사 보유 육성계통 중에서 뿌리혹병에 대한 저항성 수준이 가장 높은 계통에서 저항성 유전자와 연관된 분자표지를 개발함으로써, 무와 배추에서 뿌리혹병 저항성 품종 육성을 위한 시스템을 구축하고자 함.

- 무와 배추는 알칼리성 식품으로 체액을 알칼리성으로 유지시키는 역할을 하며, 김치의 주재료로써 우리의 식생활에 매우 중요한 위치를 차지하고 있음. 현재 김치는 국제규격을

획득하여 수출이 확대되고 있어 더욱 더 품질을 다양화하고 고급화할 필요성이 요구되어지므로 김치 종주국의 위치를 고수하기 위해서도 그 주재료가 되는 배추과 작물에 대한 기초적, 체계적인 연구가 필요함.

3. 연구개발의 범위

본 연구는 배추에 있어서 뿌리혹병 저항성 유전자원인 'ECD4' 유래 계통에서 저항성 유전자와 연관된 분자 표지를 개발함으로써 저항성 수준이 높고 안정적인 저항성을 가지는 배추 품종을 효율적으로 육성하기 위한 기초연구를 수행하는 것이다. 연구의 세부적인 내용으로는 'ECD4' 유래 계통의 뿌리혹병 저항성의 유전양상을 규명하고, 저항성 유전자와 2cM 이내로 연관된 분자 표지 3개 이상을 개발하여 특허출원 함으로써 국내에서의 배추 뿌리혹병 저항성 품종 육성을 위한 기초 데이터를 제공하고자 한다. 연구방법으로는 BSA 방법을 이용하여 분리집단에서 저항성에 연관된 PCR 산물을 cloning한 후, 염기서열을 분석하여 새로운 PCR primer를 작성하여 효율적으로 저항성 개체를 선발할 수 있는지 검정하고, 이를 유용성이 높은 공우성 SCAR 표지로 전환하고자 한다. Random Primer를 이용하여 저항성과 연관된 표지를 선발하는 작업이 어려운 경우에는 AFLP 또는 Microsatellite 표지를 이용하여 연관표지를 개발하고자 한다. 이러한 공우성 SCAR 표지를 이용하여 국내에서 시판되고 있는 배추 품종을 수집하여 분석함으로써 선발 표지로써의 활용 가능성을 검정하고자 한다.

또한 본 연구는 무에 있어서 뿌리혹병 저항성 유전자원인 '1917' 계통에서 저항성 유전자와 연관된 분자 표지를 개발함으로써 저항성 수준이 높고 안정적인 저항성을 보유한 무 품종을 효율적으로 육성하기 위한 기초연구를 수행하는 것이다. 연구의 세부적인 내용으로는 무 '1917' 계통의 뿌리혹병 저항성의 유전양상을 규명하고, 저항성 유전자와 2cM 이내로 연관된 분자 표지 2개 이상을 개발하여 국내에서의 무 뿌리혹병 저항성 품종 육성을 위한 기초 데이터를 제공하고자 한다. 세부적인 연구방법과 범위는 위의 배추에서와 동일하게 적용하여 수행하고자 한다.

제 2 장 국내·외 기술개발 현황(개조식)

제1절 배추 복합내병성 CMS 계통 조기육성과 그 체계 확립 및 분자표지인자 개발

1. 국외

- 배추과 식물에 있는 몇 가지 CMS를 배추에 도입하였으나 잡종강세 현상이 나타나지 않아 이용할 수가 없었다. 그런데 최근 양배추에 소송채(배추와 동일종)를 접목하여 새로운 소송채 CMS를 얻었다.
- 이 CMS가 일본의 몇몇 종묘사(특히 사카다 종묘사)에서 집중적으로 연구되고 있다
- 일본의 사카다 종자 회사는 미국 코넬대학의 Earle 박사팀이 배추의 원형질 배양법으로 개량한 Ogura CMS를 이용하여 1대잡종을 만들었다는 소문이 있다. 그러나 아직 확인된 바가 없다.
- 한편 식물의 응성불임성은 1대 잡종 채종에 있어서 가장 널리 이용될 수 있는 생식 생리적 특성임으로 분자생물학의 발달에 따라 응성불임성 인자를 유도하려는 연구가 많이 진행되어 왔다. 그중 Mariani 등(1960, 1962;Nature)은 인공적으로 응성불임성 인자를 만들고 이를 이용함에 있어 체조제 저항성 인자를 같이 cloning하여 형질 전환하였다.
- 이후 식물에서 응성불임성 인자를 분리해 내려는 연구가 현재 많이 진행되고 있다.
- 육종에 있어서 선발 표지 인자는 그 선발 효율 증대를 위하여 아주 중요시되어 왔다. 분자생물학이 발전함에 따라 분자표지인자의 개발 연구가 Seller와 Bechmann(1983) 이후 거의 모든 작물의 중요 형질에 대하여 추진되고 있다.
- 배추의 뿌리혹병 내병성 관련 분자 표지인자에 대하여 일본의 야채시험장이 최근에 집중적으로 연구한 바 있다. 그러나 전체 race에 대한 표지인자 개발은 아직 이루어지지 않은 것 같다.

2. 국내

- 배추의 CMS 연구는 1980년대에 원예연구소에서 Ogura CMS를 이용코자 시작한 바 있고 그 당시 필요로 하는 우리나라 각 종자회사에 CMS 자료를 분양한 바 있다.
- 그 후 몇몇 종자회사가 회사 고유의 계통을 CMS화 하였으나 F₁ 조합 검정 결과 잡종강세 현상이 나타나지 않아 이용 가치가 없었다고 한다(개인 면담).
- 한편 Mariani 등의 연구방법과 비슷하게 인위적으로 작성한 응성불임성 인자를 배추에 형질 전환하였다는 보고가 있으나(농업생명공학연구원:2001) GMO 문제 때문에 이용되지 못하고 있다고 한다.
- 농작물의 분자표지인자에 대하여는 많은 작물에서 다양하게 이루어지고 있다. 배추과 식물에 대한 연구는 우리 연구팀의 이수성 교수팀이 연구한 배추의 측아 생장 유전자, 녹색꽃양배추의 인위 돌연변이 응성불임성 유전자 및 배추 속잎의 오렌지색 발현 유전자의 분자 표지 인자가 개발되어 있다.
- 그리고 최근에 충남대학교 임용표 교수팀이 배추 뿌리혹병 저항성의 분자 표지인자를 개발 발표하였다.
- 그러나 이 표지 인자는 뿌리혹병균의 일부 race에만 이용 가능한 것으로 밝혀졌다.

제2절 Fox-hunting system을 이용한 배추속 작물의 저발현 기능유전자 대량획득 및 육종소재 창성

1. 국외

- 일본 이화학연구소의 연구그룹에 의하여 Arabidopsis로부터 155,144개의 full-length cDNA가 단리되었다. 155,144 cDNA의 3' 말단 ESTs가 14,668개의 중복이 없는 cDNA 그룹으로 분리되었고, 그 중 60%가 유전자이었다. 또한, 14,034 cDNA 그룹으로부터 5' ESTs를 획득하였고 promoter database를 구축하였다(Seki M. et al., Science 296, 141~145. 2002).
- Fox-hunting system에 의하여 Arabidopsis로부터 획득한 cDNA clone을 염기서열 분석한 결과 80%이상이 에너지 생산, 단백질 합성, 이온 항상성에 관련된 유전자이었으며, 대사, 단백질 수송, 세포전달, 세포전달 기구 및 세포조직과 관련된 유전자도 포함되어 있었다(Riechmann J.L. et al., Science 290, 2105. 2000)
- Arabidopsis의 저온처리된 엽육 및 줄기조직, rosette식물, dehydration 처리식물, 발육 단계, 건조, 열처리, UV조사, ABA 등의 호르몬 처리, 암흑 성장 식물 및 화아기관의 full-length cDNA library를 구축하여 염기서열을 결정한 후 신규 기능 유전자를 대량 획득하였다(http://mips.gsf.de/proj/thal/db/tables/tabfunc_frame.html).

2. 국내

- 국내에서는 배추의 화아기관 및 엽육조직을 이용하여 수천 개의 EST clone을 확보하고 있으나, 발현양상, 기능 및 식물 단백질 구조의 분석을 위한 유용한 소재인 full-length cDNA를 합성하여 저발현 유전자를 표준화한 후 vinary vector에 삽입시켜 Agrobacteria library를 작제한 사례가 없다. 특히 Fox-hunting system을 이용하여 식물 기능유전자를 망라적으로 획득하고 기능 해석을 행한 사례가 없다.

제3절 애기장대 응성불임 변이체를 이용한 임성관련 유전자의 분리 및 이용

1. 국내의 관련분야에 대한 기술개발현황

- 식물의 응성불임성은 생식기관 발달과정 중 다음과 같은 여러 가지 요인으로 인해 발생한다.
 - 약(Anther)의 발달 억제, 조기 퇴화 및 화기구조의 변화
 - 비정상적인 감수분열 및 배우자체의 발달
 - 약 열개의 실패: 정상적인 화분이 생산되거나 화분의 방출되지 않음
 - Callose의 조기 분해
 - 곰팡이 및 바이러스의 감염

- 여러 가지 환경요인의 변화: 광주기 및 온도
- 유전자 수준에서의 응성불임 현상의 연구는 식물분자발생학 연구의 모델로 사용되는 Arabidopsis를 대상으로 수행되어왔다. 약 조직에서 특이적으로 발현하는 전사물이 대략 3500개 정도인 것으로 추성되고 있으며, 이들 중 상당부분이 전사조절인자(transcription factor) 유전자이거나, 약내의 특수화된 세포의 분화를 조절하는데 관여하는 것으로 알려져 있다.
- 또한 여러 종류의 돌연변이 유발원을 이용하여 선발된 응성불임 돌연변이체를 대상으로 응성불임 현상의 특성을 규명하고, 임성관련 유전자들을 클로닝하는 연구가 활발하게 수행되고 있으며, 현재까지 20여종의 돌연변이체에 관한 연구가 보고되었다.
- 유전자 조작을 통한 인위적인 응성불임성의 유발에 관한 연구가 활발히 수행되고 있다. 담배의 용단조직(tapetum)에서 특이적으로 발현하는 promoter에 박테리아 RNA분해효소 유전자인 Barnase 유전자를 결합시킨 벡터를 이용하여 형질전환을 시도한 결과 많은 피자식물에서 응성불임을 유발할 수 있음이 입증되었다. 또한 Barnase 유전자에 의해 만들어진 단백질을 불활성화 시키는 유전자를 이용하여 불임 형질전환체의 임성을 회복시킬 수도 있음이 보고되었다.
- 식물의 응성불임성은 1대 잡종 채종에 있어서 가장 널리 이용될 수 있는 생식 생리적 특성임으로 분자생물학의 발달에 따라 응성불임성 인자를 유도하려는 연구가 많이 진행되어 왔다. 그중 Mariani 등(Nature 1990 374:737-741)은 인공적으로 응성불임성 인자를 만들고 이를 이용함에 있어 제초제 저항성 인자를 같이 cloning하여 형질전환 하였다.

2. 연구결과가 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치

- 응성 및 자성불임, 자가불화합성 및 Apomixis의 연구는 국제적으로 식물발생 연구의 가장 중요한 토픽으로 부상되고 있으며, 또한 농업적 이용의 잠재적 가능성이 매우 크기 때문에 식물생명공학을 위한 유전자조작 기술이 활발히 개발되고 있다.
- 따라서 가장 주요작물에 관한 응성불임 현상의 연구 및 연구결과의 농업현장에서의 활용을 위하여, 임성관련 유전자의 확보가 가장 시급한 문제이며, 이를 대상으로 체계적인 유전자 조작연구를 함으로서 1대 잡종 종자 생산과 같은 농업문제에 직접적 이용의 방안을 모색할 수 있다고 생각된다.
- 본 연구진에서 이미 Arabidopsis에서 선발하여 확보하고 있는 8종의 응성불임 변이체들은 응성 자성 생식기관 발달에 관련된 유전자 및 화분조직 특이적인 유전자의 탐색할 수 있는 유용한 풀이 될 것이며, 아울러 이들은 유전자 조작을 위한 재료로 활용되어 잠재적 활용도가 매우 클 것으로 생각된다.
- 채소종자의 1대 잡종종자를 생산하기위해 관행적으로 사용되는 3 parental system(응성불임친, 유지친, 회복친)을 사용하고 있다. 이러한 유지친을 사용하면 불임개체와 임성있는 개체가 1:1로 분리하므로 불임개체를 제외한 나머지 개체들은 제거해야 한다.
- 본 연구에서는 최근 매우 활발히 연구가 이루어지는 식물발자발생학 분야의 지식, 기술, 유전자를 이용하여, 유지친이 필요치 않는 2 parental system을 개발하려 한다. 또한 이러한 연구에 독창적으로 사용될 수 있는 유전자를 애기장대를 모델로 발굴하며, 본 연구를 통해 얻어질 기초연구자료들은 타 채소작물에서도 그대로 적용될 수 있을 것이다.

제4절 S-RNase 유전자의 RNA interference 방법에 의한 자가 화합성 사과 계통 육성

1. 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황

RNAi(RNA interference)는 형질전환 후 유전자 발현을 저해하는 현상으로 dsRNA에 의해 유도된다. dsRNA(double strand RNA)가 염기서열이 유사한 부위의 목적 유전자 혹은 프로모터의 기능을 억제 혹은 침묵시키는 기작으로(Denli and Hannon, 2003), 여러 생물종에 있어 유전자 기능을 분석하는 Knowdown 기술로 널리 쓰이고 있다. 식물에서는 dsRNA 부분을 가진 헤어핀 RNA(hairpin RNA, hpRNA)를 생산하는 형질전환 유전자에 의해 RNAi가 수행된다. 이전에는 Anti-sense로 유도된 유전자 발현저해가 식물의 유전자 기능분석에 널리 사용되어 왔다. Anti-sense로 유도된 유전자 발현 저해도 RNAi 관련현상이지만 hpRNA로 유도된 RNAi가 훨씬 더 효율적이라는 것이 알려졌다. RNAi는 식물이 바이러스의 침입에 대응하는 방어기작으로 알려져 있었으나, 최근 유전자 발현 조절, 발생 및 방어기작 등 다양한 기능을 가지는 것으로 알려져 있다(Denli and Hannon 2003). 최근에는 이러한 기작을 이용하여 이차대사산물의 함량 증가, 병저항성 육종, 응성불임 조절 등 다양하게 이용되고 있다. Arabidopsis의 변이체에 있어서는 형태 이상이 나타난 결과로부터 miRNA에 의한 endogeneous RNA slicing에 의해 발현제어가 행하여지고 있는 것이 시사되고 있다.

*Agrobacterium*을 이용한 사과형질전환 성공이 보고(James et al., 1989)된 이후 배(Bell et al., 1999), 포도(Scorza et al., 1996), 오렌지(Gutierrez-E et al., 1997) 등 여러 과수에서 형질전환에 의해 소수형질이 개량된 신품종 육성의 가능성이 제시되어 왔다. 국내의 사과형질전환 연구는 상명대학교 원예과학과에서 *Agrobacterium*을 이용한 사과 '후지'의 형질전환 재분화 효율에 관한 연구와 원예연구소(현 국립원예특작과학원)와 포항공대 공동연구로 *Agrobacterium*을 매개한 사과 'McIntosh Wijcik' 품종의 개화조절에 관한 형질전환 연구가 되어 왔다. 2003년에는 원예연구소에서 *Agrobacterium*을 이용한 사과 '후지' 품종의 형질전환으로 특허출원을 하여 2006년 특허로 등록되기도 하였다. 유전자 도입 이외에 형질전환체 재분화에 관련하여 원예연구소에서 효율적인 재분화체계를 마련코자 재분화 배지 및 발근배지의 적정 항생제 농도 구명에 대해 연구하였다.

2. 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

우리나라 사과의 주품종인 'Fuji' 에 S-alleles의 RNAi법을 이용하여 자가결실성인 'Fuji' 사과의 형질전환체는 타과수류에서 이용되는 것과 마찬가지로 자가결실성 품종육성에 교배친으로 이용될 수 있다. 사과에 있어서 자가결실성 품종의 개발은 인공수분에 따르는 노동력, 경비절감과 더불어 개화기의 기상이변 및 환경오염 등의 불안정한 환경에서도 안정적인 생산을 가능하게 할 수 있다. 또한 이는 앞으로의 사과육종의 소재로 이용될 수 있다.

유전자 발현 억제의 여러 방법 중 본 실험에 이용된 RNAi 기법은 '유전자 knock out 방법' 보다 더 효과적이라 알려져 있다. 과수류에서 국내 처음으로 시도된 RNAi 기술개발은 타과수류 포도, 복숭아 등에서도 gene function을 밝혀내거나, virus 내병성 van종 육종 등 여러 목적에 적용될 수 있다. 또한 형질전환 후 mRNA 전사시 목적유전자가 hairpin RNAi 구조를 형성하기 위하여 각 S-RNase 유전자 단편을 sence 방향과 antisence 방향으로 삽입되게 하고 이들의 중간부분에 애기장대의 intron이 위치하도록 한 pK7GWIWg2(II) vector의

이용은 RNAi를 이용한 고효율 gene silencing에 유용하게 적용될 수 있다.

사과 형질전환 시 가장 문제가 되는 낮은 형질전환율 향상에 필요한 요인을 분석한 실험은 앞으로 사과 형질전환에 필요한 주요한 기술로 이용될 수 있다. 공동배양 기간 동안의 ethylene 억제제의 효과적인 처리를 통하여 *Agrobacterium*의 infection율과 신초 재분화를 높일 수 있어 사과뿐만 아니라 타과수류의 형질전환실험에도 적용할 수 있다. 또한 공동배양 후 *Agrobacterium* 제거에 필요한 항생제의 농도와 종류 및 post selection을 이용한 형질전환율 향상은 형질전환을 통한 분자유종기술로 이용될 수 있다.

따라서 본 연구를 통하여 개발된 RNAi를 이용한 자가화합성 사과의 기술개발은 첫째, RNAi를 통한 자가화합성 'Fuji'형질 전환체는 자가결실성 품종육성에 교배친 혹은 품종으로 이용될 수 있고, 형질전환체는 특허출원을 통한 지식재산권의 확보가 가능할 것이고, 둘째, 형질전환율 향상을 위한 사과의 형질전환기술은 타과수류 등에 적용이 가능하고, 특히 ethylene억제제를 이용한 형질전환율 향상기술은 특허출원이 가능하다. 셋째, hpRNAi를 이용한 gene silencing 기술은 앞으로 유전자 발현억제 실험 등을 위한 기초자료로 유용하게 활용되어질 수 있을 것이다.

제5절 분자마커를 이용한 무·배추의 무사마귀병 저항성 선발 마커 개발

1. 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황

뿌리혹병은 한국과 일본에 있어서 배추과작물의 수확량을 감소시키는 주요 병으로 알려져 있으며, 토양전염성 병해로서 진정활물기생균인 *Plasmodiophora brassicae*에 의해 발병하며 초기에 뿌리에 비대한 혹 모양의 구조를 형성하여 작물의 생육을 저해하는 것으로 알려져 있으나 발병기작이나 저항성계통에서의 저항성 기작에 대한 연구는 전무한 실정이다. 일본과 유럽에서는 뿌리혹병에 대해 저항성을 가지는 품종을 육성하기 위해 저항성원으로 알려진 유럽순무 (European fodder turnip)를 이용하여 저항성 배추품종을 많이 육성하였고, 이에 대한 저항성의 유전양상을 밝히는 연구를 많이 수행하였다. 배추 뿌리혹병 저항성품종을 육성하기 위해 국내에서는 'CR Shinki' 계통을 많이 이용하였고, 이 계통에서의 저항성 유전자의 유전양상을 밝히는 연구와 더불어 저항성과 연관된 분자표지를 개발하는 연구를 많이 수행하였다. 일본에서는 'Siloga'와 'Milan White' 계통을 이용한 연구가 많이 진행되고 있으며 이들 저항성계통을 이용한 저항성 연관 표지 선발이나 저항성 유전자와 mapping과 같은 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다. 이러한 연구 결과를 보면 유럽순무 (European fodder turnip)에서의 저항성 유전양상은 하나 이상의 주동유전자와 여러 개의 미동유전자에 의해 저항성이 유전된다고 보고되고 있다. 최근에는 유럽순무 중에서 뿌리혹병 병원균의 병원성검정을 위한 differential host로 이용되는 'ECD4' 계통은 *P. brassicae* isolate에 대해서도 높은 저항성을 보이는 것으로 보고되고 있으므로, 이 계통을 이용한 배추 저항성품종 육성이 절실히 요구되고 있는 실정이다. 그러나 배추와는 달리 무의 경우에는 뿌리혹병이 무의 생산량 저하에 큰 영향을 미치지 않고 있으며, 배추와는 다르게 뿌리혹병에 저항성을 보이는 계통이 국내에도 존재하므로 크게 문제는 되지 않는 실정이다. 그러나 병원균은 병원성의 변이가 다양하고 돌연변이율도 높아 머지않은 장래에 무에서도 큰 문제를 일으킬 가능

성이 높은 것으로 예측되고 있고, 실제로 대단위 경작지에서는 발병이 서서히 증가하고 있어 다양한 종류의 저항성 품종이 시급히 요구되고 있다.

2. 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

본 연구에서 제시된 연구결과는 국내외 어느 기관에서도 보고한 적이 없는 새로운 결과로 판단된다. 배추의 경우, 많은 계통들에 대해 저항성 유전자의 유전양식이나 연관지도 작성, 연관표지 개발 등의 연구가 이루어져 대외적으로 발표가 되고 있는 실정이다. 그러나 본 연구에서 사용한 뿌리혹병 저항성계통인 'ECD4' 계통에서의 저항성유전자에 대한 유전양식이나 연관표지 개발 등과 같은 기초연구는 전무한 실정이다. 그러므로 본 연구에서 개발된 배추 뿌리혹병 저항성 연관 분자표지는 전혀 새로운 유전자원에 존재하는 저항성유전자를 배추에 도입할 수 있는 획기적인 연구결과로, 다양한 병원균에 대해 광범위한 저항성을 보이는 새로운 배추 품종을 육성하는데 큰 기여를 할 것으로 판단된다. 무 뿌리혹병 저항성의 경우에는 기존에 비슷한 연구가 수행된 사례가 없으며 대외적으로 공개된 정보도 전무한 실정이다. 이러한 현 상황에서 개발된 무의 뿌리혹병 저항성 연관 분자표지는 세계적으로 유일한 연구결과이며, 뿌리혹병에 대한 저항성 품종육성에 대한 새로운 패러다임을 만들 수 있는 연구결과라 판단된다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제1절 배추 복합내병성 CMS 계통 조기육성과 그 체계 확립 및 분자표지 인자 개발

1. 연구 목표 및 내용

가. 배추 CMS 계통 조기육성

배추 뿌리혹병과 바이러스병(TuMV)에 복합 내병성인 소포자 유래 순계(DH 계통)62 계통을 재검정하여 복합내병성 계통을 선발하고 그들의 원예적 형질을 조사하였다. 그리고 그들 중 결구력이 약한 A형 계통과 결구력이 강한 B형 계통을 구분하여 소송채 CMS에 교잡하였다. 교잡된 F₁ 종자와 여교잡 할 반복친 A 및 B형의 두 계통을 이용하여 BC₁F₁ 채종을 완료하고 F₁과 BC₁F₁ 및 반복친 A, B 계통을 동시에 재배하여 세대 진전에 따른 집단 고정 정도를 검정하였다. 여기서 선발된 F₁과 BC₁F₁에 반복친을 여교잡하여 BC₁F₁ 및 BC₂F₁ 세대의 종자를 채종하였다. 이 종자를 2차년도(2006) 3월 하순이전에 다시 과종하여 AFLP를 수행하고 반복친과 유사한 개체를 선발하여 그 후대, BC₂F₁ 및 BC₃F₁을 채종하였다. 이 BC₂F₁ 및 BC₃F₁ 종자를 채종하는 과정에 1차년도와 2차년도에 선발해 둔 우량계통을 교잡하여 F₁조합 종자를 채종하고 BC₂F₁, BC₃F₁과 함께 가을재배에서 특성을 조사하였다. 그리고 AFLP를 수행하여 반복친과 유사한 개체를 선발토록 하였다. 3차년도에는 육안선발과 AFLP 근연계수에 의한 선발의 차이점을 확인코자 하였다. 따라서 KCMS3M-291(B형)의 BC₂F₁과 BC₁F₁ 및 KCMS 3M-33-3 (A형)의 BC₁F₁과 KCMS 3M-65-1(A형)의 BC₁F₁에서 육안 검정과 AFLP로 그들 각각의 반복친과 유사한 근연 개체 및 거리가 먼 원연 개체를 선발하였다. 여기서 선발된 개체를 성숙모본으로 겨울 동안에 춘화처리하고 4차년도 초봄부터 교잡하여 각각의 후대를 채종하였다. 그중 KCMS3M-291(B형)의 BC₂F₁에서 초기에 수확된 종자 BC₃F₁를 다시 과종하고 저온처리하여 세대축진(1년 2세대)을 시도하였다. KCMS3M-291(B형계통)의 BC₂F₁은 상당히 고정되어 있었으므로 그 선발 개체의 후대 BC₃F₁와 그 반복친에 그동안 육성하여온 주요 A형 계통을 교잡하였다.

이렇게 봄 동안에 교배하여 채종된 종자는 가을에 재배하면서 CMS계통은 세대 진전에 따른 순도 향상을 육안과 AFLP로 검정하였다. F₁조합은 잡종강세 정도를 조사하는 한편 품종 등록 가능 F₁ 조합을 선발토록 하였다.

나. TuMV-C4 마커 개발

TuMV-C4에 이병성인 순계와 내병성인 순계를 교잡하여 만든 F₁조합을 소포자 배양하여 많은 반수성2배체(DH 계통)계통을 육성하였다. 이들과 F₁조합에 이병성친을 여교잡한 BC₁F₁ 집단의 내병성을 검정하여 BSA-AFLP용 재료를 확보하였다. 먼저 DH 계통의 내병성과 이병성 계통을 확실히 구분한 후 내병성과 이병성 균을 10~12계통씩으로 한 bulked segregant method로 AFLP하고 각 균의 특이밴드를 찾아내었다. 이 밴드가 각각의 해당계통에서 나타나는지 확인하고 분리집단의 각 개체에 적용하여 마커로서의 정확성을 확인하였다. 그리고 이용하기에 편리한 SCAR마커로 전환하여 다시 검정하였다. 즉 기존의 양성된 내병성과 이병성 친 간의 F₂ 및 BC세대를 과종하고 어린 모 때에 개체별로 DNA를 채취하여 개발된 SCAR 마커로 내병성 유무를 조사하고 동일 개체에 바이러스 접종원을 접종하여 이병성 유무를 조사하였다. 이 결과를 이용하여 개발된 SCAR 마커의 내병성 유전자와의

조환가를 산출하고 유전양식을 비교 검토하였으나 불행하게도 이 마커가 정확성이 없었었다. 그 원인을 밝히고자 SCAR마커로 증폭된 DNA의 염기서열을 분석해본 결과 transposon 영역을 다량으로 가지고 있음을 알게 되었다.

그런데 마침 농촌진흥청의 농업생명공학연구원에서 개발한 20mer 내외의 SSR primer 238쌍을 도입할 수 있어 이를 이용한 마커를 탐색하였다. 반수성2배체 계통 중 TuMV-C4에 내병성인 VC-1과 이병성인 SR-5를 교잡하여 만든 F₁을 자가수분과 여교잡으로 유전분석용 F₂세대를 확보하는 한편, 소포자 배양으로 DH계통을 약 100여 계통 만들었었다. 이들 F₂세대와 DH 계통에 카보란덤법으로 TuMV-C4를 1주일 간격으로 2차에 걸쳐 접종하고 한 달 후 바이러스 증상의 유무를 육안으로 조사하였다. DH계통 중 내병성과 이병성 계통을 구분하고 각각 10계통씩으로 bulk를 만들어 SSR primer를 polyacrylamide gel로 screening 하였다. Bulk간에 polymorphism을 보인 primer를 선발하여 bulk의 계통을 우선 검정하였다. 그리고 F₂, BCP_R, BCP_S 집단의 개체에 선발된 SSR primer를 적용하였다. 나아가 BCP_S 집단의 개체에 나타난 결과로서 조환가를 계산하여 개발된 마커의 연관정도를 산출하였다.

2. 연구 결과

가. 배추 CMS 계통 조기육성

이 항은 5개년 간 수행한 내용이 양적으로 많을 뿐 아니라 계통의 세대진행과 관련된 것으로 표기 등이 아주 복잡하다. 따라서 연차별로 연구결과를 기술코자 한다.

1) 1년차 : CMS 계통으로 육성할 복합내병성 재료의 검정 및 선발

과거에 뿌리혹병과 바이러스병(TuMV C-4)에 복합 내병성인 것으로 선발되어 보존중인 62계통을 다시 검정한 결과 뿌리혹병 발생 계통은 하나도 없었으며, 바이러스병은 한 계통에서 비슷한 증상을 나타내었을 뿐 모두 복합 내병성으로 확인되었다(표 1-1). 그런데 우리나라 배추는 최근에 모두 속잎색이 노란 황심종으로 급격히 바뀌고 있다. 만일 황심종이 아니면 비록 복합 내병성일지라도 이용가치가 크지 못할 것으로 판단되어 내병성 검정에 공시된 계통을 가을에 노지재배하면서 1차로 황심 계통을 선발하고 그들의 기타 특성을 조사하였다. 즉 속잎의 끝이 마르는 석회 결핍증(Tipburn)과 액아 발생 주는 비록 황심종이라도 이용가치가 적다고 생각하여 제외하였다. 그 결과 표 1-2에서 보는 바와 같이 선발 계통수는 복합 내병성 군 62계통 중 11.3% 정도인 7계통 밖에 없었다. 표 1-3은 선발된 황심 계통의 특성이다. 이들 중 VCS 3M 유래의 B형 1계통과 VCS 13M 유래의 A형 1계통을 선정하여 소송채 CMS에 교잡하였다(표 1-4 참조)

표 1-1. 배추 기 보유 계통의 뿌리혹병과 바이러스병 재 검정 결과

| 소포자배양 친 | 재검 계통수 | 뿌리혹병 발생계통수 | 바이러스병 발생계통수 | 복합내병성 계통수 |
|---------|--------|------------|-------------|-----------|
| VCS 3M | 35 | 0 | 1 | 34 |
| VCS 13M | 27 | 0 | 0 | 27 |
| 계 | 62 | 0 | 1 | 61 |

표 1-2. 소포자 배양 재료별 우량 황심 계통의 출현 량

| 소포자 배양 F ₁ 조합 | 검정 계통수 | 선발 계통수 | 비율 |
|-----------------------------|--------|--------|------|
| VCS 3M | 35 | 4 | 11.4 |
| VCS 13M | 27 | 3 | 11.1 |



그림1-1. 배추의 석회결핍증(좌)과 액아발생(우)

표 1-3. 배추 선발된 복합 내병성 황심 계통의 주요 특성

| 과종 번호 | 계통명 | 내엽색 ^z | 초자 | 결구 정도 | 주중 (kg) | 구중 (kg) | 엽장 (cm) | (A,B) |
|----------|--------|------------------|-----|----------|------------|------------|------------|-------|
| 04특-258 | VCS | 3.5 | 반개장 | 강 | 2.8 | 1.4 | 42 | B |
| | 3M-23 | | | | | | | |
| 265 | -93 | 4.0 | 반개장 | 강 | 2.3 | 1.3 | 37 | B |
| 285 | -291 | 3.5 | 개장 | 강 | 2.0 | 0.9 | 34 | B |
| 286 | -302 | 4.0 | 반개장 | 중 | 2.1 | 0.9 | 37 | B |
| 290 | VCS | 3.5 | 반개장 | 약 | 1.6 | 0.4 | 39 | A |
| | 13M-33 | | | | | | | |
| 296 | 65 | 3.5 | 반개장 | 약 | 2.0 | 1.0 | 24 | A |
| 299 | -72 | 3.5 | 직립 | 약 | 1.2 | 0.4 | 47 | A |

z : 내엽색 : 1(백색)-5(진노랑)



그림 1-2. 선발된 배추 복합내병성 황심 계통

표 1-4. 배추 CMS에 교잡한 친 별 F₁채종 성적

| 여교잡친 | 자식 종자수 (립) | 교잡 종자수 (립) | 교잡 화수 | 교잡화 당 종자 수 | 비고 |
|----------------|---------------|---------------|-------|---------------|----|
| VCS 3M-291-1-1 | 254 | 370 | 39 | 9.5 | |
| VCS 13M-33-2 | 101 | 37 | 57 | 0.7 | |
| 1003AM-2-1 | 53 | 639 | 55 | 11.6 | |
| 계 | 408 | 1047 | 151 | 6.9 | |

2) 여교잡, 근연개체 선발 및 채종

배추의 다른 계통이 두 번 교잡된 소송채 CMS에 3대 병해에 복합내병성인 두 계통, VCS 3M-291과 VCS 13M-33, 그리고 아직 내병성이 검정되지 않은 한 계통 1003A-1M-2를 교잡하였다(표 1-4). 반복친 중 VCS 13M-33-2의 경우는 교배화 당 종자 수가 0.7립으로서 채종량이 충분하지 못하였으므로 특성 조사에만 이용하고 다른 두 계통은 충분한량의 종자가 채종되었으므로 복합내병성 검정과 특성검정을 모두 수행하였다. 그리고 복합내병성 친과의 교잡 세대는 친과 가장 가까운 개체를 선발코자 내병성을 검정하고(표 1-5) AFLP를 수행하였다(후술). 그리고 그들의 원예적 형질도 조사하였다(표 1-6).

표 1-5. 배추 CMS 계통에 교잡한 계통의 내병성 검정 결과

| CMS 계통명 | 과종량 | 조사 주수 | 복합 내성주 수 | 뿌리혹병 이병주 수 | 바이러스병 이병주 수 | 복합 감염주 수 |
|------------|-----|----------|-------------|---------------|----------------|-------------|
| 1003A-1M-2 | 200 | 104 | 0 | 0 | 0 | 104 |
| VCS 3M-291 | 200 | 165 | 165 | 0 | 0 | 0 |
| 계 | 400 | 269 | 165 | 0 | 0 | 104 |

표 1-6. 배추 CMS 여교잡 세대의 특성

| 여교잡 친별 | 순도 ^z | 내엽색 | 외엽색 | 초자 | 결구 정도 | 주중 (kg) | 엽장 (cm) | 내엽수 | 석회 결핍증 |
|---------------------|-----------------|-----|-----|-----|----------|------------|------------|-----|-----------|
| VCS3M- 291(반복친) | 1 | 3 | 녹 | 반개장 | 강 | 2.3 | 35 | 50 | 없음 |
| 교잡 세대 | 3 | 4 | 녹 | 개장 | 중 | 2.7 | 48 | 37 | 없음 |
| VCS13M- 33(반복친) | 1 | 3 | 녹 | 반개장 | 중 | 2.1 | 39 | 51 | 있음 |
| 교잡 세대 | 3 | 3 | 연녹 | 개장 | 약 | 1.1 | 50 | 33 | 있음 |
| 1003AM- 2-1(반복친) | 1 | 2 | 녹 | 반개장 | 강 | 2.9 | 43 | 63 | 없음 |
| 교잡 세대 | 3 | 3 | 연녹 | 개장 | 약 | 2.6 | 49 | 31 | 없음 |

z:순도:1(양)-9(불량)

먼저 특성조사 결과 CMS 계통의 순도가 외형상으로는 상당히 좋은 것 같이 보였다. 그러나 자세히 보면 초자, 결구성, 엽장, 내엽수 등에서 아직 반복친과 크게 다른 것으로 나타났다. 이러한 사실은 사진에서도 잘 나타나고 있다. CMS 계통은 반복친과 함께 AFLP를 수행하고 있는데 그 중 반복친에 가장 가까운 개체를 선발하여 다음 여교잡을 위한 모계로 이용될 것이다.

3) 기타 보유 계통(DH line) 중 황심 계통의 선발

시중 판매 품종 중 2 품종을 소포자 배양하여 획득한 계통, 중국 우량 F₁ 품종의 소포자 유래 계통, 그리고 기타 기 보유 계통을 공시하여 원예적 형질을 조사코자 하였다. 이 역시 황심 계통을 우선 선발한 후 그들의 특성을 조사하였다.

표 1-7. 우량 F₁의 소포자 유래 계통 중 황심 계통 수

| 소포자 배양 F ₁ 종 | 공시 계통수 | 선발계통 | 선발율(%) |
|-------------------------|--------|------|--------|
| 01-33-1-1M | 13 | 8 | 61.5 |
| 01-33-2-1M | 6 | 2 | 33.3 |
| 02-33-01-1M | 8 | 1 | 12.5 |
| 기타 | 9 | 3 | 33.3 |
| 계 | 36 | 14 | 38.8 |

표 1-8. 주요 선발 황심 계통의 특성

| 계통명 | 내엽 색 | 외엽 색 | 초자 | 결구 정도 | 주중 (kg) | 구중 (kg) | 엽장 (cm) | 내엽 수 | 결구형 (A,B) |
|-----------|---------|---------|-----|----------|------------|------------|------------|---------|--------------|
| 104-3 | 6 | 녹 | 개장 | 중 | 1.9 | 0.9 | 37 | 57 | A |
| CR-1 | 5 | " | 반개장 | 강 | 2.5 | 1.4 | 40 | 67 | A |
| VCS371-46 | 6 | 농녹 | 개장 | " | 2.1 | 1.3 | 45 | 68 | A |
| -66 | 5 | " | 반개장 | " | 2.3 | 1.3 | 34 | 64 | B |
| -68 | 5 | " | 개장 | 약 | 2.2 | 1.2 | 46 | 52 | B |
| -70 | 6 | " | " | " | 3.1 | 2.0 | 43 | 62 | A |
| -72 | 5 | 녹 | " | 극약 | 1.8 | - | 37 | (36) | B |
| -80 | 6 | " | 반개장 | 약 | 1.6 | 0.9 | 45 | 63 | A |
| -92 | 5 | 농녹 | " | 중 | 3.3 | 1.8 | 46 | 62 | A |
| -94 | 5 | 녹 | " | " | 2.2 | 1.2 | 39 | 56 | A |
| 미상 | 4 | 농녹 | " | 강 | 2.1 | 1.2 | 38 | 42 | A |

황심이면서 다른 결점이 없어 선발된 계통이 14개로 그 비율이 1/3이상 이었다(표 1-7, 1-8). 특히 시중 판매되고 있는 한 F₁의 후대는 대부분이 황심 계통으로 나타났는데 이는 이 F₁의 양친이 모두 우수한 황심 계통이었음을 시사한다고 할 수 있을 것이다. 그런데 다른 한 F₁ 품종의 유래 계통은 황심 정도가 약하고, 단축경이 지나치게 길다든가 석회 결핍 증상이 있어 선발된 계통이 2개뿐이었다. 특히 북경신3호(02-33-01-1M) 품종은 중국 북경 지역의 주요 보급 품종으로 인기를 누리고 있어 이를 소포자 배양한 것인데 그 유래 계통은 대부분이 석회 결핍증, 잎 끝이 저온 피해증, 단축경이 지나치게 길게 자라는 등의 결점을 보였고, 황심 정도도 약하여 한 계통만 선발되었다. 이 선발된 계통은 복합 내병성을 검정하여 CMS에 여교잡 할 A 및 B친으로 선발하는 한편 기존 복합내병성이면서 황심종인 것과 교잡하여 복합 내병성 황심 계통의 다양성 확보에 이용될 것이다.



그림 1-3. 선발된 일부 황심 계통의 모양

2) 2년차

반복친에 유사한 개체를 선발코자 반복친(VCS3M-291) 506번 계통을 대비로 F₁ 개체에 대하여 AFLP를 수행하였다. 개체수가 90개이었으므로 하나의 젤 판에 함께 전기영동을 할 수 없어 각 primer마다 두개의 젤 판에 나누어 전기영동 하였다. 먼저 primer18-8부터 7개의 primer로 AFLP를 수행하고 전기영동에서 나타난 polymorphic밴드를 헤아려 덴드로그램을 작성하였다. 그 결과 각 gel판마다 반복친에 근연인 것과 원연인 것이 구별되었다(그림 1-4, 1-5). 그러나 각기 다른 gel판상의 원연관계를 동일한 것으로 간주하여 개체를 선발하는 것은 다소 무리라고 생각되었다. 따라서 각 gel판상의 근연개체와 원연개체를 6개체씩 선발하여(3개체는 공통)합계 12개체로 다시 위와 동일한 7개 primer로 AFLP를 수행하였다. 그 결과 헤아릴 수 있는 밴드가 461개였는데 이들을 기초로 덴드로그램을 그렸다(그림 1-6). 이 정도로 과연 근연관계 또는 원연관계의 개체를 선발하여도 괜찮을지 확실하기가 어려워 다시 새로운 primer 4개를 첨가하여 11개의 primer에 의한 band 786개로 dendrogram을 작성하였다(그림 1-7). 그 결과 반복친과의 근연 개체는 앞의 7개 primer로 얻은 결과와 약간 다른 현상을 보였고 원연개체는 동일한 경향을 보였다. 그런데 7개의 primer외에 더 첨가한 다른 4개의 primer로 얻어진 밴드 325개만으로 dendrogram을 그려보았을 때(그림 1-8) 11개의 primer로 그린 것과 근연관계의 순서가 거의 일치하는 결과를 보였다. 이러한 결과는 이 반복친의 경우 이 4개의 primer만으로도 근연과 원연관계의 개체를 충분히 선발할 수 있음을 시사하는 것으로 생각되었다.

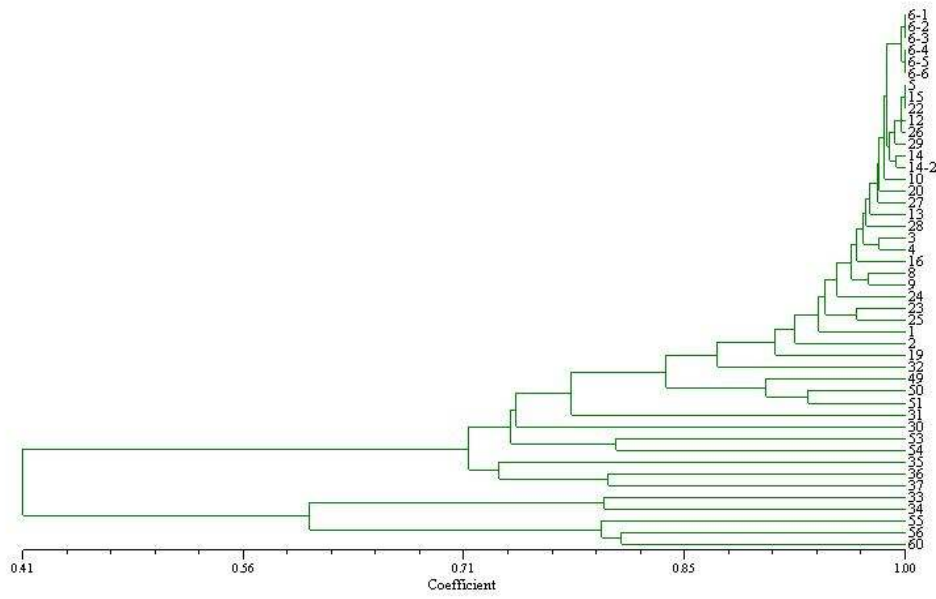


그림 1-4. MS 530의 유연관계(제1판) : primer 7개
 ※ 6-1~6: 반복친

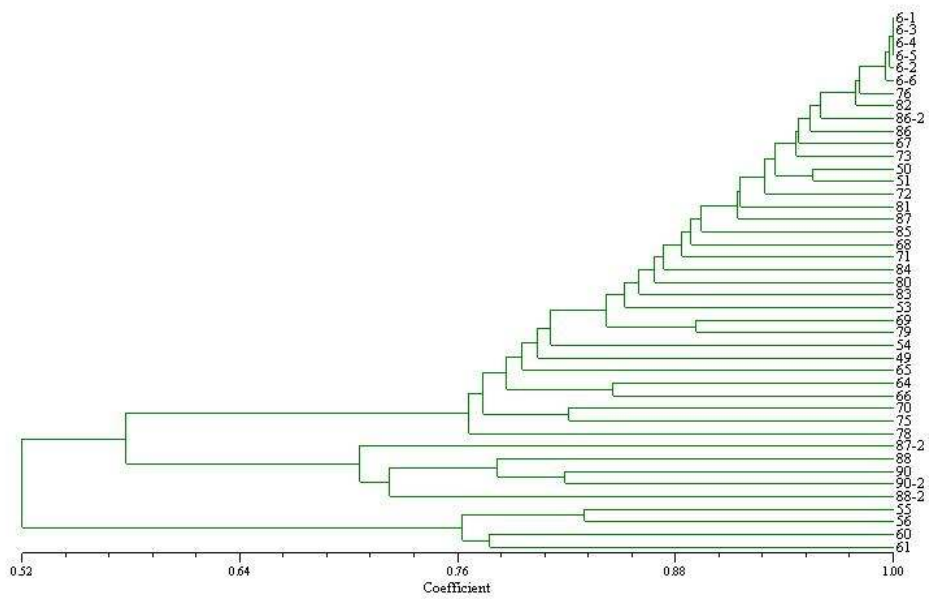


그림 1-5. MS 530 유연관계(제2판)
 primer 7개. 6-1~6: 반복친

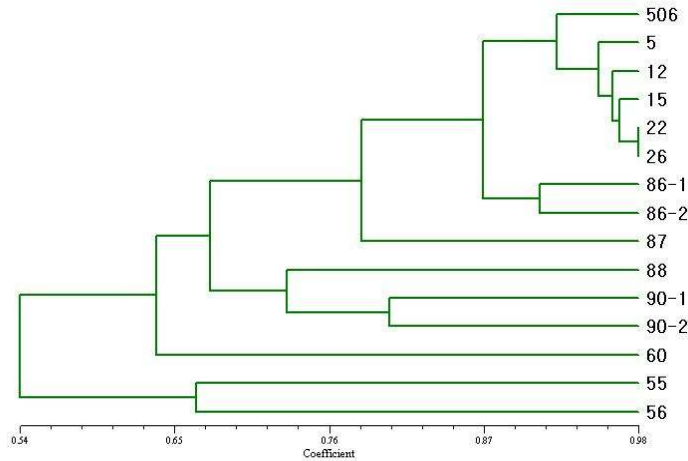


그림 1-6. 두 판의 선발 개체 간 근.원관계(18-8~15)
primer 7개. 506: 반복친

선발된 F_1 12개체 중 근연개체 3개체(그림 1-6의 12, 15, 26번 개체)에서 채종된 것을 다시 후대(BC_1F_1)채종을 위하여 파종하였다. 그리고 어린 식물에 대하여 선발된 primer 4개로 AFLP를 수행하였다. 3개의 집단 중 제1집단(파종번호:631)은 개체수가 많아 역시 2개의 젤 판으로 나누었는데(그림 1-9, 1-10) 제1젤 판에서 19, 35번의 2개체를 반복친(파종번호:630)과 가장 가까운 개체로 선발하고(그림 1-9) 제 2 젤판에서는 62, 89, 94번의 3개체를 선발하였다(그림 1-10). 다른 두 번째 집단(파종번호:632)은 개체수가 45개체였는데 그중 12, 13, 39번의 3개체를(그림 1-11) 선발하였다. 그리고 마지막 한 집단(파종번호:633)은 개체수가 22개였는데 그 중 7과 14번의 두 개체를 선발하였다(그림 1-12).

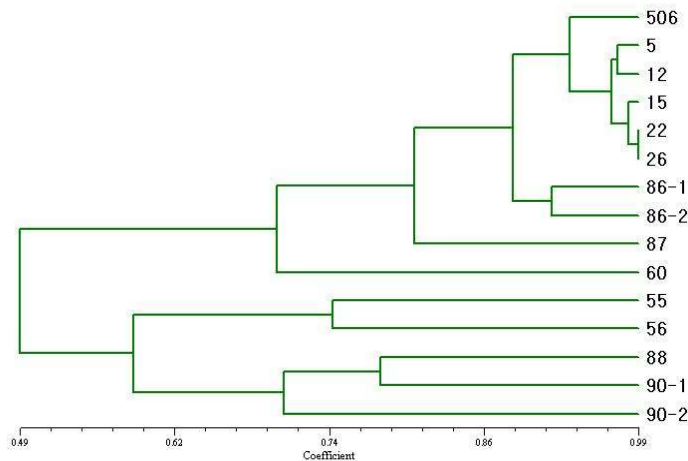


그림 1-7. 두판의 선발 개체간 근.원관계(18-1~15)
11개 primer. 506: 반복친.

한편 앞에서 선발된 F₁ 12개체의 각각에서 채종된 BC₁F₁ 계통 중 1 계통을 제외한(채종량 부족) 11개를 모두 포장에 재배하고 그들의 특성을 조사하였다. 그 결과 육안으로 보기에 근연개체와 중간 개체 유래의 계통들은 대체로 순도가 좋은 것 같이 보였다. 그러나 반복친이 동일하였음에도 계통 간에는 상당히 다른 형질을 나타내었다. 원연 개체 유래의 계통은 역시 육안으로 보기에 개체 간 차이가 심하였다. 실제로 주종과 엽수 최대 잎의 길이 등을 조사하고 집단별로 변이계수를 산출하였는데(그림1-13) AFLP에 의한 덴드로그램상 원근관계 및 육안으로 관찰한 것과 비슷하게 근연개체 후대는 그 계수가 작고 원연개체 후대는 그 계수가 크게 나타났다. 이러한 결과는 AFLP에 의한 근연개체 선발이 분리세대의 형질 고정을 앞당기게 할 수 있음을 시사한다고 할 수 있을 것 같다.

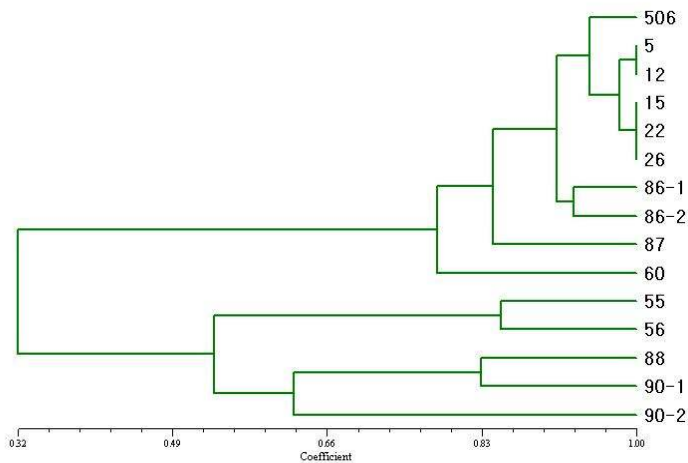


그림 1-8. 근.원선발(18-1, 2, 4, 6)
 new primer 4개. 506: 반복친
 12, 15, 26번 개체 선발

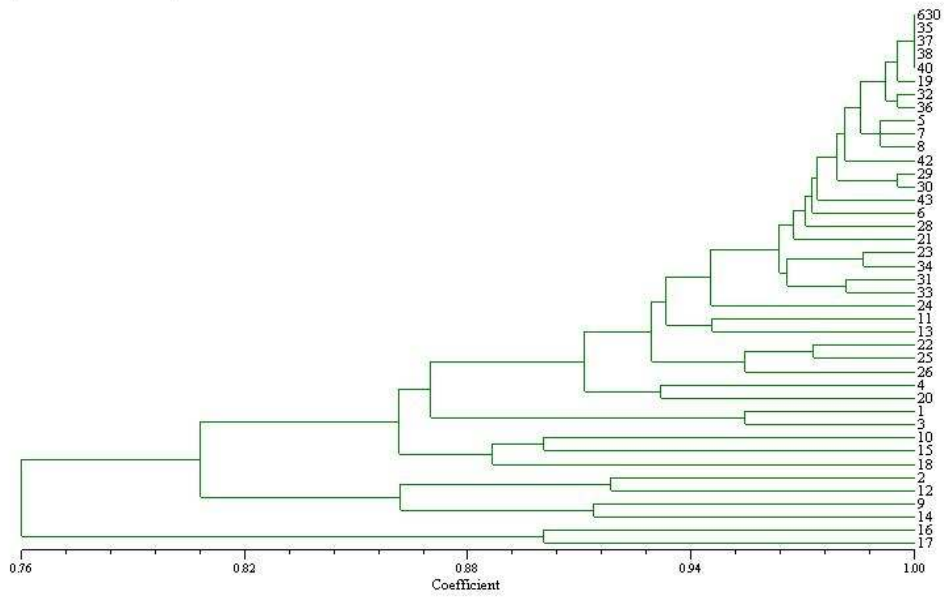


그림 1-9. BC₁F₁세대 제1집단(631)의 근.원선발
제1판(18-1,2,3,6). primer 4개.
630: 반복친. 19. 35번 개체 선발

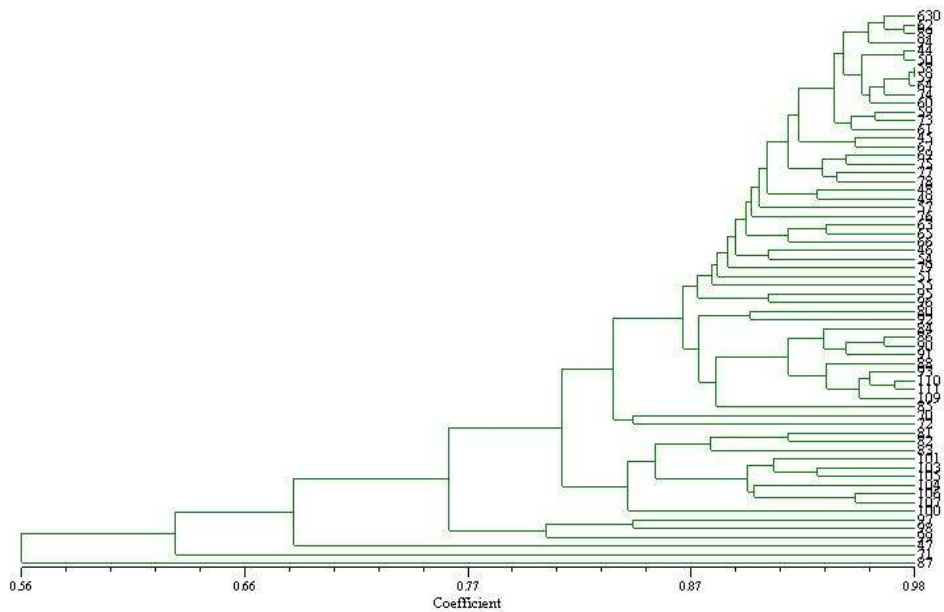


그림 1-10. BC₁F₁세대 제1집단(631)의 근.원선발.
제2판(18-1,2,3,6). primer 4개.
630: 반복친. 62, 89, 94번 개체 선발

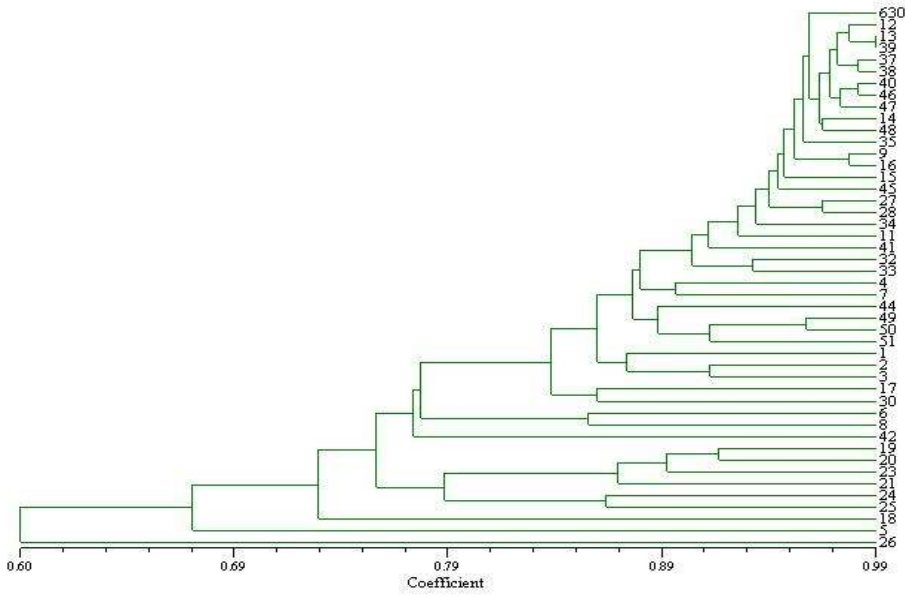


그림 1-11. BC₁F₁세대 제2집단(632)의 근.원선발
 (18-1,2,3,6): primer 4개.
 630: 반복친. 12.13.39번 개체 선발

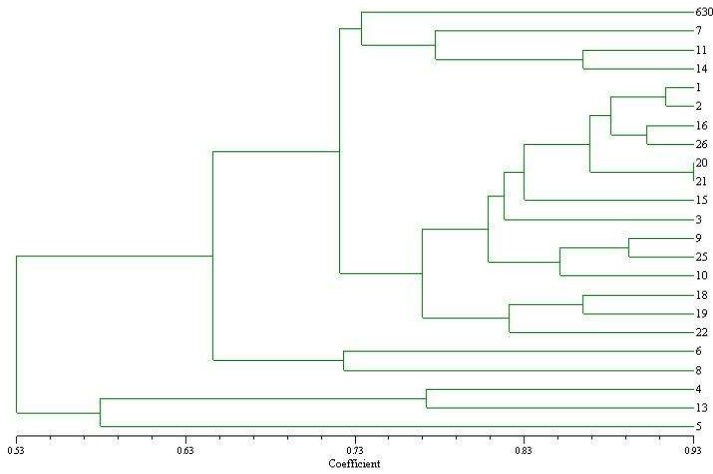


그림 1-12. BC₁F₁세대 제3집단(633)의 근.원선발
 (18-1,2,3). primer 4개.
 630: 반복친. 7. 14번 개체 선발

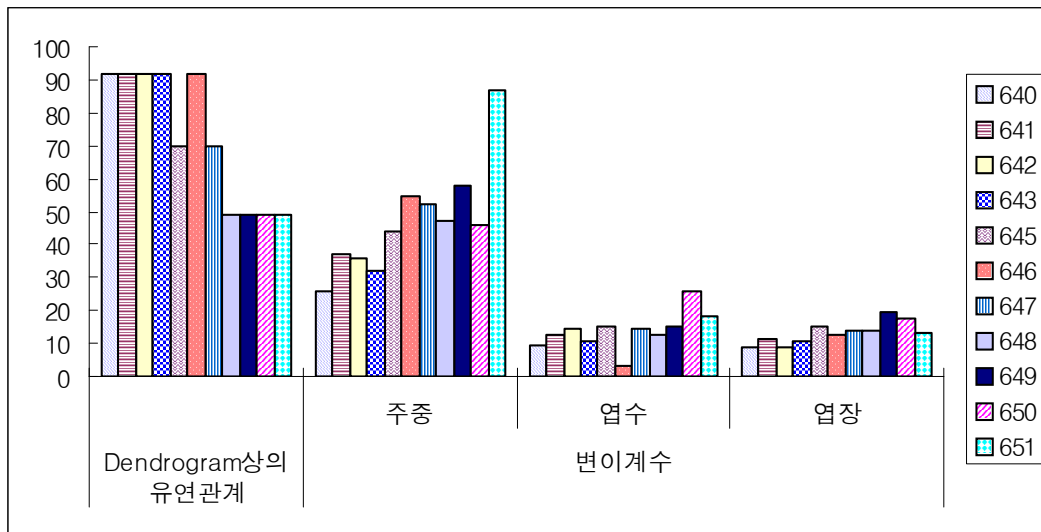


그림 1-13. 배추 잡종 CMS와 반복 친과의 F₁ 조합에서 AFLP의 근연계수에 따라 선발된 근·원 개체 후대의 변이 계수

3) 3년차

'05년(2년차) 가을에 한 F₁인 CMS 계통 CMS3M-291에서 반복친에 유사한 근연개체 3개체를 선발하여 3차년도 봄에 그 후대를 재종하였다(표 1-9). 이 후대종자 즉 BC₁F₁ 종자를 각각 156립, 105립, 118립씩 가을에 파종하였다. 그리고 다른 3개의 F₁인 CMS 계통 CMS-13M-33-2, CMS-13M-33-3, CMS-13M-65의 종자를 각각 101립, 102립, 80립씩 파종하였다. 그리고 식물이 어릴 때에 DNA를 추출하여 AFLP를 수행하였다(그림 1-14, 15, 16, 17, 1-18. 그림 1-19, 20, 21). 그 결과에 따라 반복친과 근연관계에 있는 개체와 원연관계에 있는 개체를 계통마다 각각 2개체씩 선발하여 저온처리를 하고 2월 하순 이전에 그 후대 즉 BC₂F₁ 및 BC₁F₁ 종자를 최대한 많이 재종토록 노력하였다.

표 1-9. 배추 CMS계통의 06년도 종자 생산량

| 과종번호 | 계통명 | AFLP 근연관계 | 채종량 (립) | 세대 | F ₁ 조합의 양친 형 |
|-------------|-----------------|--------------|------------|--------------------------------|----------------------------|
| 05MS-631-19 | CMS3M-291-12-19 | 근연 | 198 | BC ₂ F ₁ | B형 |
| -35 | -35 | | 68 | | |
| -50 | -50 | | 245 | | |
| 05MS-632-12 | CMS3M-291-15-12 | | 136 | | |
| -13 | -13 | | 353 | | |
| -39 | -39 | | 310 | | |
| 05MS-633-14 | CMS3M-291-26-14 | | 18 | | |
| 05MS-635-1 | CMS13M-33-2-1 | 원연 | 235 | BC ₁ F ₁ | A형 |
| -2 | -2 | " | 43 | | |
| -3 | -3 | " | 223 | | |
| -4 | -4 | " | 374 | | |
| -6 | -6 | 근연 | 88 | | |
| -11 | -11 | " | 66 | | |
| -14 | -14 | " | 377 | | |
| -41 | -41 | " | 40 | | |
| -43 | -43 | " | 154 | | |
| 05MS-637-10 | CMS13M-33-3-10 | 근연 | 196 | BC ₁ F ₁ | A형 |
| -14 | -14 | " | 198 | | |
| -15 | -15 | " | 91 | | |
| -16 | -16 | " | 81 | | |
| -27 | -27 | " | 226 | | |
| -28 | -28 | " | 455 | | |
| -33 | -33 | 원연 | 101 | | |
| -43 | -43 | 근연 | 68 | | |
| -44 | -44 | 원연 | 66 | | |
| -50 | -50 | 원연 | 288 | | |
| 05MS-639-1 | CMS13M-65-1-1 | 근연 | 1.063 | BC ₁ F ₁ | A형 |
| -5 | -5 | " | 301 | | |
| -6 | -6 | - | 510 | | |
| -8 | -8 | - | 582 | | |
| -10 | -10 | " | 860 | | |
| -11 | -11 | 원연 | 1.068 | | |
| -12 | -12 | 근연 | 1.113 | | |
| -13 | -13 | 원연 | 686 | | |

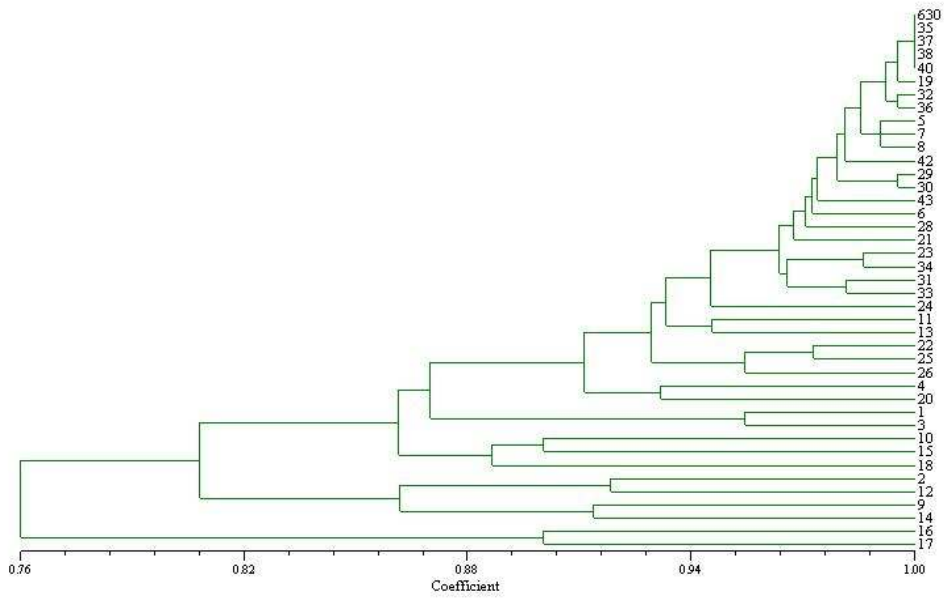


그림 1-14. CMS 3M-291-12(근연개체)의 후대 BC₁F₁(103개체 중 40개체)의 AFLP결과

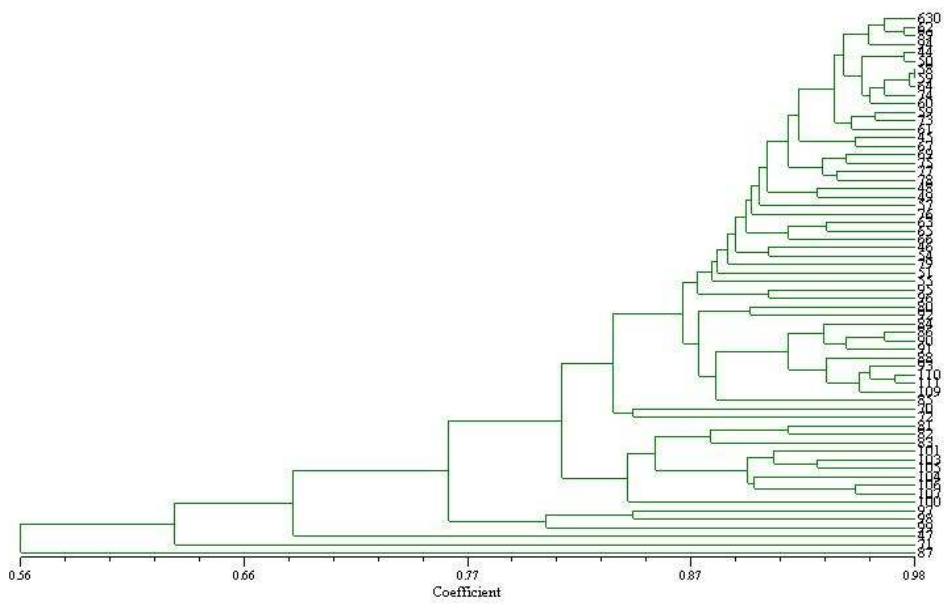


그림 1-15. CMS 3M-291-12(근연개체)의 후대 BC₁F₁(103개체 중 60개체)의 AFLP결과

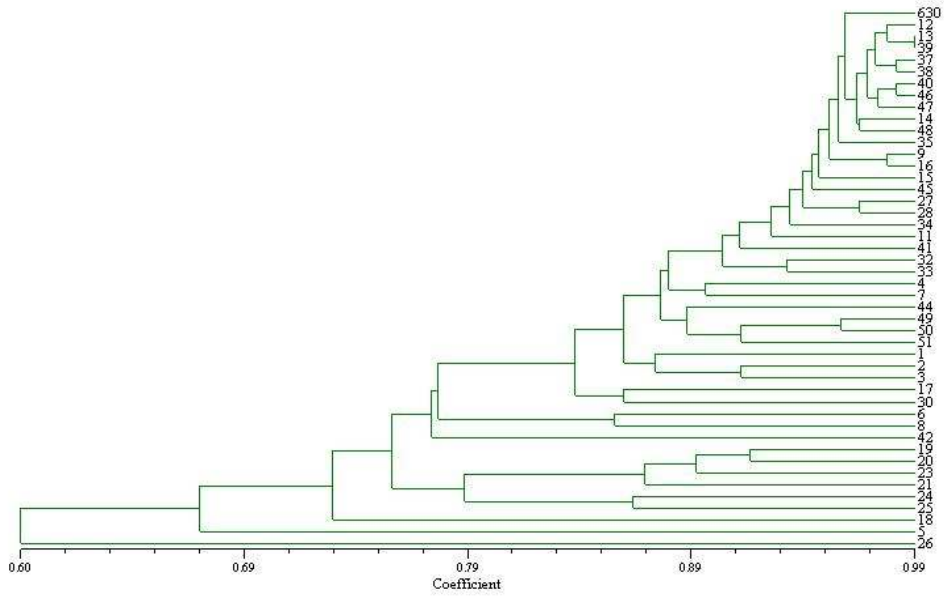


그림 1-16. CMS 3M-291-15(근연개체)의 후대 BC₁F₁의 AFLP결과

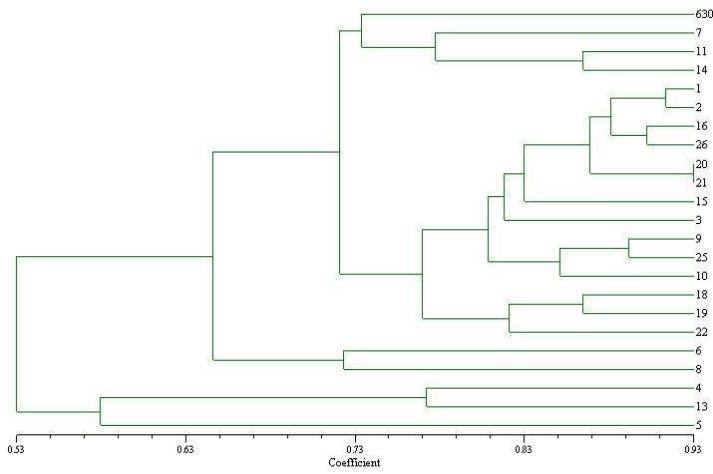


그림 1-17. CMS 3M-291-26(근연개체)의 후대 BC₁F₁의 AFLP결과

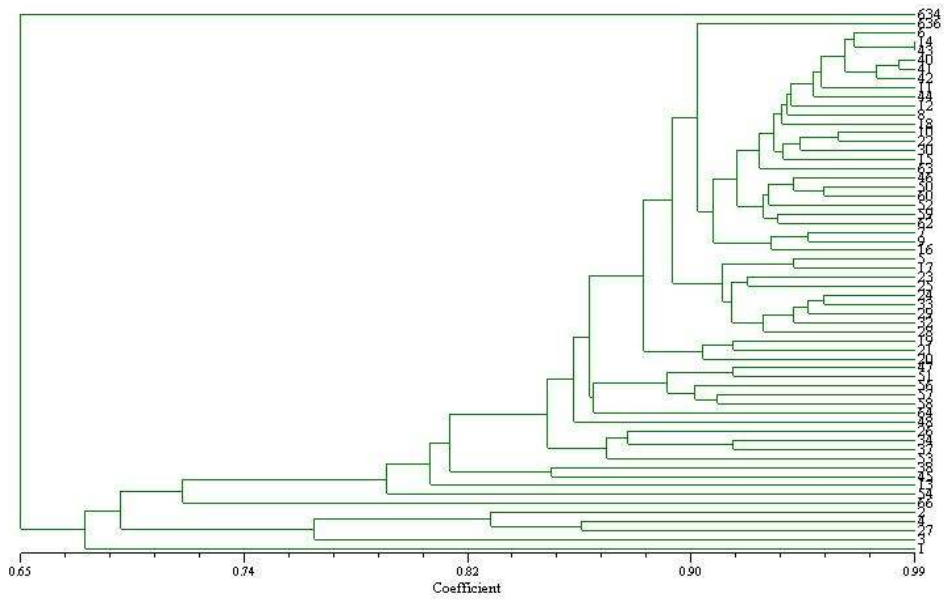


그림 1-18. CMS F₁ 13M-33-2의 AFLP결과

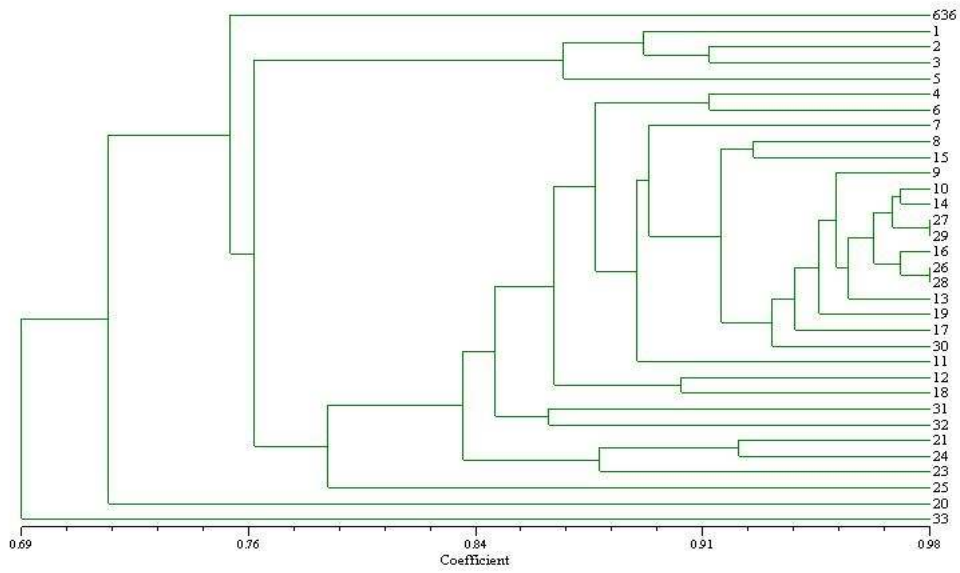


그림 1-19. CMS F₁(CMS 13M-33-3)의 AFLP 결과
71개체 중 32개체

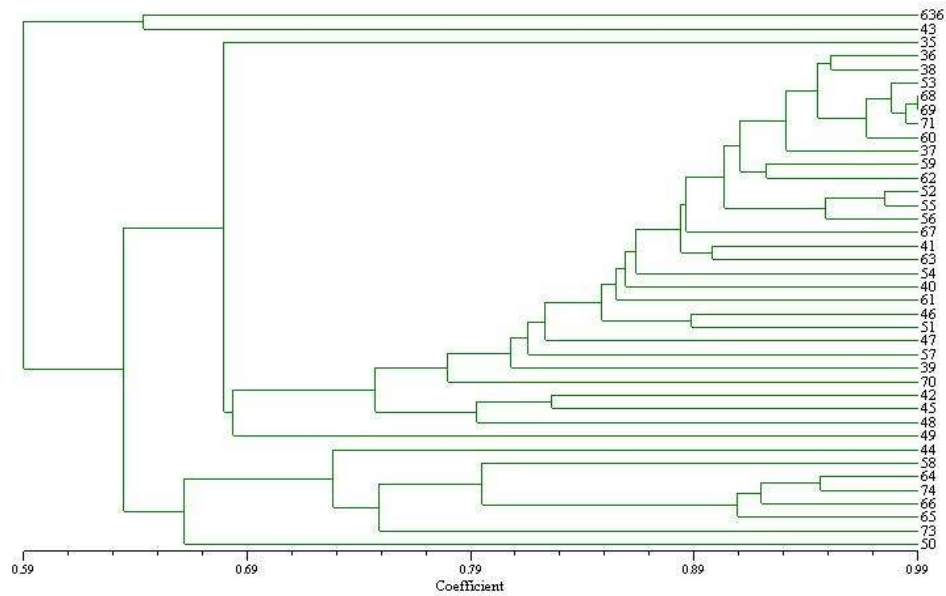


그림 1-20. CMS F₁(CMS 13M-33-3)의 AFLP 결과
71개체 중 남은 39개체

그러나 극히 일부 개체만이 2월 말경에 채종이 가능하였고 기타 개체는 모두 3월 이후에 종자를 얻을 수 있었다. 즉 1년에 2세대 진전을 시도하였으나 다소 무리임을 알게 되었다. CMS3M-291의 BC₁F₁ 3계통 중 2계통에서 2월 하순에 얻어진 종자(BC₂F₁)를 1년 2세대 진전이 가능한지 검토코자 각각 37립과 129립을 서둘러 3월 초순에 파종하였다. 그 중 37립을 파종한 06MS-916(CMS3M-291-12-35 -19) 유래의 계통은 9개 밖에 발아하지 않았다(그림 1-22). 그러나 129립을 파종한 06M-917계통은 43주를 확보할 수 있었다. 이 발아한 43개체의 DNA를 추출하여 AFLP를 수행하고(그림 1-23) 근연관계라고 생각되는 4개체를 선택하여 저온처리 후 후대채종(BC₃F₁)을 시도하였다. 그러나 7월의 고온과 장마로 개체가 극도로 연약하여 표 1-10에서 보는 바와 같이 아주 적은 양의 종자만을 얻을 수 있었다. 즉 단순한 세대축진만을 생각하면 그리고 저온에 아주 민감한 계통이면 1년에 2세대씩 진전시킬 수 있겠지만 어린 식물의 DNA를 추출한 후 저온처리하여 개화를 유도하는 경우에는 1년에 2세대가 무리라고 생각되었다.

한편 이상과 같이 1년 2세대 진전을 위한 노력을 하면서, 그리고 개체가 너무 연약하여 자가수정 종자를 얻는 것도 힘들 정도였으므로 이들 CMS 계통을 모본으로 한 F₁ 종자생산을 할 수가 없었다.

CMS3M-291계통은 F₁세대, BC₁F₁세대, 그리고 BC₂F₁의 3세대에 걸쳐서 AFLP에 의한 근연 또는 원연개체를 선발하였다. 그런데 세대가 진전될수록 AFLP상에 나타나는 polymorphic band의 수가 크게 줄어드는 현상이 나타났다(표 1-11). 각 조합마다 최초로 이용된 CMS 계통이 순계가 아니고 서로 다른 계통이 2~3차례 교잡되었던 유전적으로 잡박한 것이었으므로 이들과 교잡한 F₁이 순계간의 F₁처럼 순도가 균일한 것이 아니고 잡박할 수밖에 없다. 따라서 F₁세대에서부터 AFLP로 반복친의 근연개체를 선발하였던 것이다.

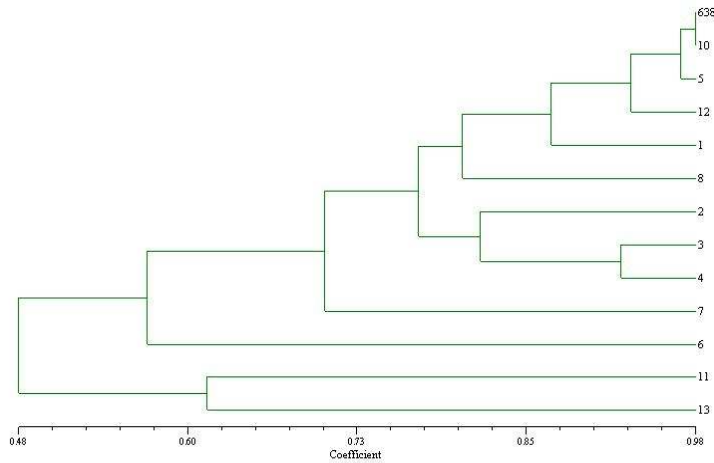


그림 1-21. CMS F₁(CMS 13M-65-1)의 AFLP 결과

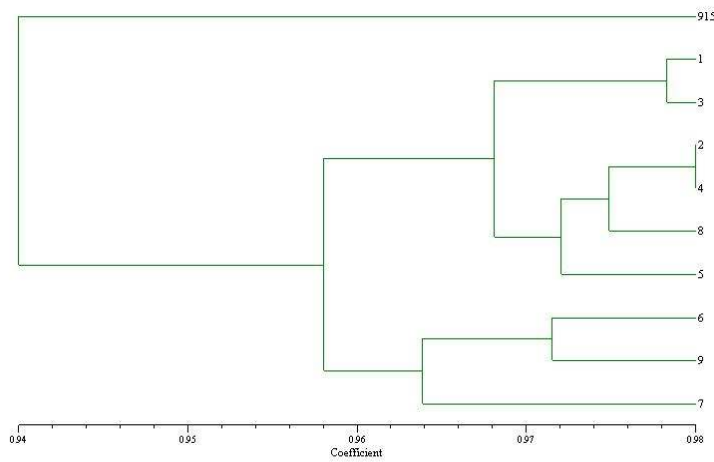


그림 1-22. 배추의 CMS 계통의 BC₂F₁ 세대에 있어서의 AFLP 결과(그림 1-19의 후대)

F₁검정에서 90개체의 개체 간 차이를 나타내는 특이밴드의 비율이 89.3%로 아주 높았다. 이 집단에서 AFLP상의 근연개체라고 나타난 3개체를 선발하여 BC₁F₁세대를 채종하고 검정하였다. 그 결과 이용한 primer수가 적고 검정된 개체수가 적기는 하지만 특이 밴드율이 80.3~49.1%로 상당히 낮아진 것을 볼 수 있었다. 그리고 BC₁F₁의 두 집단 각각에서 근연이라고 나타난 개체를 선발하여 BC₂F₁을 채종하고 조사하였는데 특이 밴드율이 9.5~17.4%로 크게 떨어졌다. 즉 집단의 순도가 크게 높아졌다는 것이다. 전통육종법의 육안조사만으로 선발하였을 경우와 비교하지 못하는 아쉬움이 있지만 BC₂F₁ 집단에서 다시 한 번 AFLP로 반복친과 유사한 개체를 선발하여 BC₃F₁을 얻는다면 1대잡종 품종 육성에 필요할 정도의 고정된 CMS 집단이 될 것을 기대할 수 있을 것 같았다.

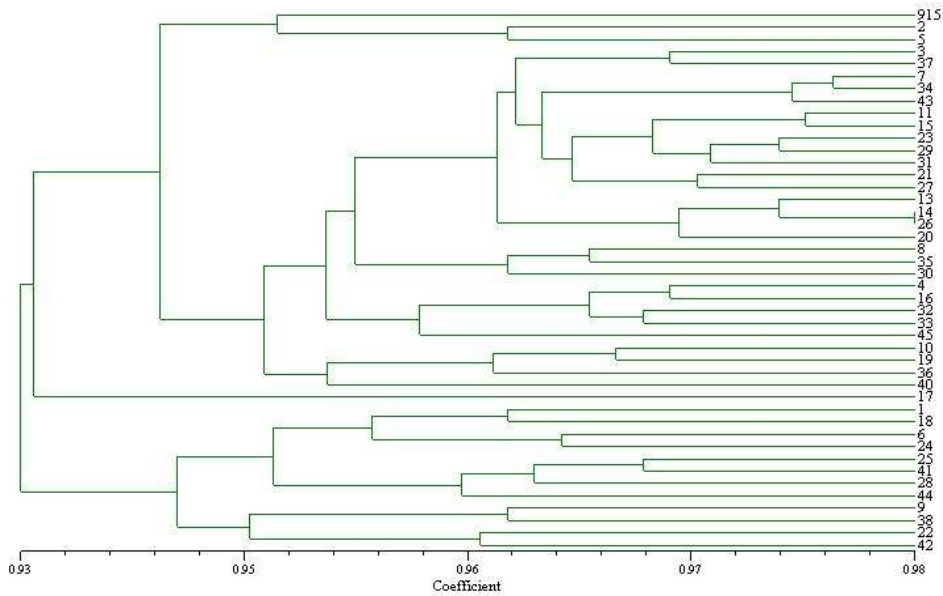


그림 1-23. 배추의 CMS 계통의 BC₂F₁ 세대에 있어서의 AFLP 결과(그림 1-11의 후대)

표 1-10. 배추 CMS3M-291 계통의 BC₃F₁ 종자 획득

| 파종번호 | 계통명 | 반복친 유사성 | 종자량 |
|------------|----------------------|---------|-----|
| 06MS-917-1 | CMS3M-291-15-13-39-1 | 원거리 | 34 |
| -4 | -4 | 중간 | 13 |
| -5 | -5 | 근거리 | 2 |
| -8 | -8 | " | 2 |
| -15 | -15 | " | 6 |
| -23 | -23 | " | 4 |
| -37 | -37 | " | 15 |

그런데 가을에 동일 포장에 재배한 F₁, BC₁, BC₂의 집단 중 F₁을 제외한 BC₁, BC₂ 세대의 대부분의 개체가 상당히 심한 속잎의 황화현상을 나타내었다(그림 1-24). 과거에 Ogura CMS의 배추 계통을 재배하였을 때 세대가 경과하여도 속잎이 황화하여 이용할 수 없었던 것을 경험한바 있다. 따라서 이 소송채 CMS가 혹시 Ogura CMS 일지도 모르겠다는 의구심이 생겼다. 사실 소송채 자체의 돌연변이로 생긴 CMS이기 때문에 무의 CMS와 동일할 수는 없을 것으로 생각하였지만 혹시나 하는 생각에서 Ogura CMS의 유전자 orf138 유전자의 증폭용 프라이머를 작성하여 검정하여 보았다. 그 결과 놀랍게도 이 소송채 CMS가 무의 Ogura CMS와 동일한 유전자임을 나타내었다(그림 1-25). 따라서 비록 이 소송채 CMS

의 고정 계통을 얻는다하더라도 F₁을 만들었을 때 잡종강세현상이 나타날 것인가 하는 강한 의문이 생기지 않을 수 없었다.

표 1-11. 배추 CMS 3M-291 계통의 여교잡 세대별 AFLP상의 polymorphic band 수와 유전적 유사도

| 계통 | 세대 | 구분 | 공시 개체수 | primer 수 | 특이밴드수 /전체밴드 | 특이밴드 율(%) | 유전적 유사도 |
|----------|--------------------------------|-------|--------|----------|-------------|-----------|-----------|
| 3M-291 | F ₁ | - | 90 | 11 | 702/786 | 89.3 | 0.49-0.99 |
| | BC ₁ F ₁ | 근연1 | 40 | 4 | 107/218 | 49.1 | 0.76-1.00 |
| | | 근연2 | 63 | 4 | 130/219 | 59.4 | 0.56-0.98 |
| | | 근연3 | 45 | 4 | 191/248 | 77.0 | 0.60-0.99 |
| | BC ₂ F ₁ | 근연1후대 | 22 | 3 | 147/183 | 80.3 | 0.53-0.93 |
| | | 근연2후대 | 9 | 11 | 66/693 | 9.5 | 0.94-0.98 |
| | | | 43 | 11 | 114/656 | 17.4 | 0.93-0.98 |
| 13M-33-2 | | - | 57 | 4 | 126/150 | 84.0 | 0.65-0.99 |
| 13M-33-3 | F ₁ | - | 32 | 4 | 129/214 | 60.3 | 0.69-0.98 |
| " | | - | 39 | 4 | 153/209 | 73.2 | 0.59-0.99 |
| 13M-65 | | - | 12 | 4 | 143/182 | 78.6 | 0.48-0.98 |



그림 1-24. 배추 KCMS 3M-291(BC₂F₁)계통(우)과 그 반복친 계통과의 비교(좌)

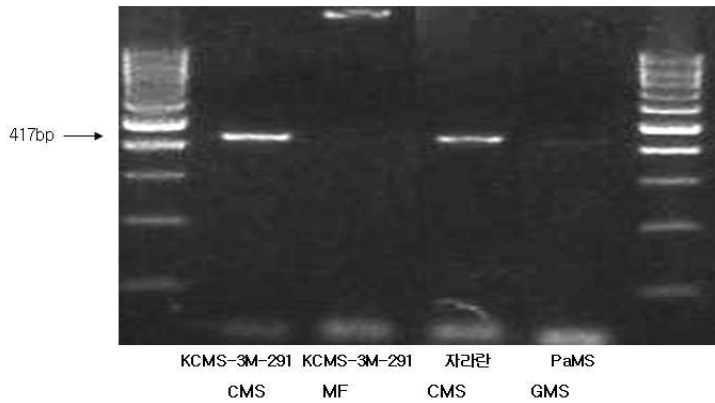


그림 1-25. KCMS3M-291 계통의 Ogura CMS 유전자 orf138 밴드 발현

가을에 CMS3M-291 유래의 BC₃F₁과 BC₂F₁을 6집단 파종하였다. 1-2개 집단으로도 시험목적을 달성할 수 있지만 행어나 하는 생각에서 5개 집단을 파종하였는데 한 집단은 100주 이상, 다른 한 집단은 약 29주(17주+12주)의 개체를 확보할 수 있었을 뿐 다른 3개 집단은 발아율이 극히 저조하여 개체 확보에 실패하였다(표 1-12). BC₃집단은 8개체를 포장에 재배할 수 있었다. 이 집단들을 예년과는 달리 포장에서 일반 재배법에 따라 재배를 하면서 육안으로 반복친에 가까운 개체와 멀다고 생각되는 개체를 각각 6개체와 3개체씩 선발하였다. 그리고 한 편으로는 DNA를 모두 추출하여 AFLP를 진행하였다.

한편 새로운 CMS 계통 CMS13M-33-3과 CMS13M-65의 BC₁F₁은 F₁에서 반복친에 근연이었던 것과 원연이었던 집단 각각을 재배 중이며 이들의 AFLP가 진행 중이다. 이들 역시 각 구마다 육안으로 근연과 원연 개체를 선발해두고 있으며 AFLP결과가 나오는 대로 비교하여 근연과 원연인 개체를 선발하고 내년 봄 BC₂F₁ 채종에 이용할 것이다.

표 1-12. CMS계통의 파종 및 발아율

| 파종번호 | 전시험 파종번호 | 계통명 | 파종 량 | 발아 수 |
|-----------|-------------------|--|---------|---------|
| 06CMS-236 | 05MS-917-4x915 | KCMS3M-291-15(BC ₃ F ₁) | 75 | 8 |
| 230 | 05MS-631-19x630 | KCMS3M-291-19(BC ₂ F ₁) | 170 | 17 |
| 231 | 05MS-631-50x630 | KCMS3M-291-50(BC ₂ F ₁) | 195 | 12 |
| 232 | 05MS-632-39x630 | KCMS3M-291-39(BC ₂ F ₁) | 198 | 110 |
| 233 | 05MS-641-25x630 | KCMS3M-291-25(BC ₂ F ₁) | 60 | 0 |
| 234 | 05MS-646-33x630 | KCMS3M-291-33(BC ₂ F ₁) | 100 | 3 |
| 235 | 05MS-651-20x630 | KCMS3M-291-20(BC ₂ F ₁) | 36 | 1 |
| 237 | 05MS-635-4x636-3 | KCMS13M-33-2-4(BC ₁ F ₁) | 178 | 8 |
| 238 | 05MS-635-14x636-5 | KCMS13M-33-2-14(BC ₁ F ₁) | 150 | 63 |
| 239 | 05MS-637-28x636-2 | KCMS13M-33-3-28(BC ₁ F ₁) | 227 | 35 |
| 240 | 05MS-637-50x636-2 | KCMS13M-33-3-50(BC ₁ F ₁) | 172 | 58 |
| 241 | 05MS-639-1x638-3 | KCMS13M-65-1(BC ₁ F ₁) | 120 | 12 |
| 242 | 05MS-639-11x638-3 | KCMS13M-65-11(BC ₁ F ₁) | 120 | 43 |
| 243 | 05MS-639-12x638-4 | KCMS13M-65-12(BC ₁ F ₁) | 120 | 71 |
| 06특-915 | 05MS-630 | 3M-291-1-1-1-1-2-1(RP) | 10 | 9 |
| 93 | 05MS-630 | 3M-291-1-1-1-1-2-1(RP) | 24 | 24 |
| 95 | -636 | 13M-33-3-1-5(RP) | 24 | 2 |
| 96 | -638 | 13M-65-1-4(RP) | 24 | 19 |

4) 4년차

가) KCMS 3M-291 계통(B형)의 반복친 유사계통 선발

먼저 KCMS3M-291의 BC₃F₁은 전체 8개체밖에 정식할 수가 없었으며 BC₂F₁ 3계통은 시험이 불가능할 정도였고 2계통은 발아 후에도 생육상태가 좋지 않아 전체 10개체밖에 정식할 수가 없었다. 그런데 BC₃F₁은 비록 8개체뿐이지만 AFLP의 반복친과의 근연계수가 0.96이상으로 아주 높게 나타났으며(그림 1-26) 포장에서 속잎이 황화되는 것 외에는 반복친과 다르게 보이

는 개체가 없었다. 뿐만 아니라 8개체 모두가 아주 균일하여 어느 것을 특별히 선발한다는 것이 무의미할 것 같았다.

BC₂F₁의 2계통(과종번호 06CMS- 230과 231)은 F₁에서 반복친에 가까웠던 1개체에서 유래한 것이므로 동일한 계통으로 간주하고 육안으로 반복친에 가까운 것과 먼 것을 먼저 구분하였다. 그리고 AFLP를 수행하여 DNA상 가까운 개체와 먼 개체를 구분하였다. 그 결과가 그림 1-27과 표 1- 13인데 육안으로도 아직 고정이 덜 된 개체가 보였으며 AFLP에서도 근연계수가 0.916~0.954로 비교적 높지 않았다. 계속 고정하면서 AFLP에 의한 선발효율을 비교코자 육안으로 근연관계이면서 AFLP상에서도 근연인 개체(14, 15, 2, 3번 개체)와 육안으로 근연인데 AFLP상 원원처럼 나타난 1개체(13번 개체)을 선발하고(표 1-13). 성숙모본으로 후대를 채종하였다.

KCMS 3M-291의 BC₂F₁중 남은 다른 한 계통(06 CMS-232)은 110주를 정식하였는데 역시 고정도가 1대잡종 채종에 이용할 정도는 못되는 것 같았다. 그런데 이 계통은 F₁과 BC₁에서 AFLP로 반복친과 가까운 개체를 선발하였기 때문에 이번에는 육안으로 먼저 선발한 개체에 대하여 AFLP의 근연계수를 보고자 하였다. 따라서 육안으로 반복친에 가까운 7개체와 먼 개체 3개체를 먼저 선발하였다. 그리고 그들에 대하여 AFLP를 수행하였다. 그 결과가 그림 1-28과 표 1-14인데 AFLP의 유사도가 0.929~0.964로 비교적 높게 나타났다. 그런데 육안으로 반복친에 가깝다고 생각되었던 개체 중 36번 개체는 AFLP상 원거리였으며 반복친에 멀다고 생각되었던 25번 개체는 AFLP상 가장 근거리에 있는 것으로 나타났다.

이처럼 육안으로 선발된 10개체가 AFLP 결과와 일치하지 않는 것이 10개체 중 2개 있었다. 그리하여 육안과 AFLP상 모두 근거리로 나타난 3개체(37, 38, 47번 개체)와 서로 일치하지 않는 2개체(25, 36번 개체)를 선발하여 후대 채종을 도모코자 하였다.

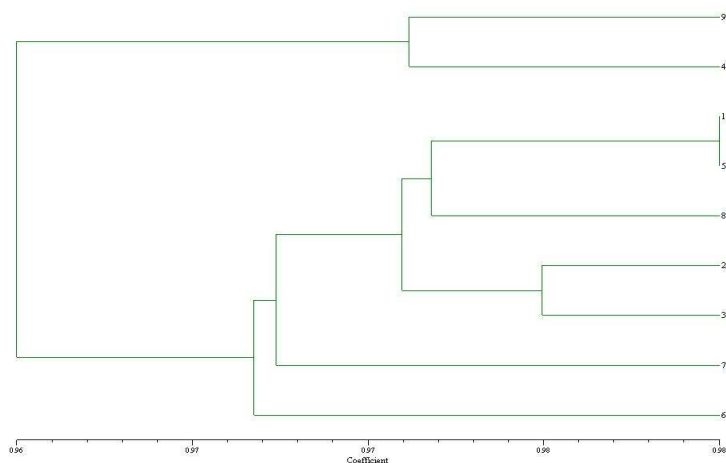


그림 1-26. CMS 3M-291-15, BC₃F₁의 AFLP dendrogram(93 : 반복친)

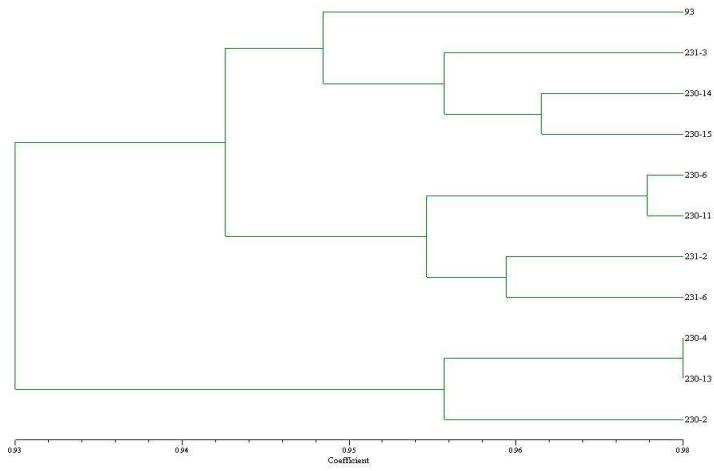


그림 1-27. CMS 3M-291-12, BC₂F₁의 AFLP dendrogram(93 : 반복친)

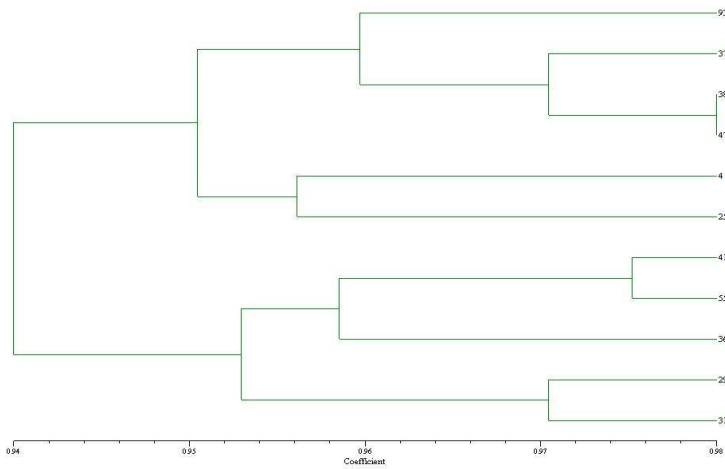


그림 1-28. CMS 3M-291-15의 BC₂F₁에서 육안으로 선발된 10개체의 AFLP dendrogram(93 : 반복친)

표 1-13. CMS 3M-291, -12, 의 BC₂F₁ 세대 반복친에 대한 근연관계

| 개체번호 | 육안검정 | AFLP | | 선발주 | 비고 |
|-----------|----------|--------------|----------|-----|----|
| | | 근연계수 | 근, 원 | | |
| 230-2 | 원 | 0.916 | 원 | | |
| 4 | 원 | 0.922 | 원 | | |
| 6 | 원 | 0.933 | 원 | | |
| 11 | 근 | 0.940 | 근 | | |
| 13 | 근 | 0.916 | 원 | 0 | |
| 14 | 근 | 0.953 | 근 | 0 | |
| 15 | 근 | 0.947 | 근 | 0 | |
| 231-2 | 근 | 0.932 | 근 | 0 | |
| 3 | 근 | 0.954 | 근 | 0 | |
| 6 | 근 | 0.940 | 근 | | |

※ AFLP의 근연계수 범위 : 0.916~0.954

표 1-14. CMS 3M-291-15의 BC₂F₁세대에서 육안으로 선발된 개체의 반복친에 대한 AFLP 유사도

| 개체번호 | 육안검정 | AFLP | | 선발주 | 비고 |
|---------------|----------|--------------|----------|-----|----|
| | | 근연계수 | 근, 원 | | |
| 232-25 | 원 | 0.958 | 근 | 0 | |
| 29 | 원 | 0.931 | 원 | | |
| 4 | 근 | 0.951 | 근 | | |
| 31 | 근 | 0.945 | 원 | | |
| 36 | 근 | 0.929 | 원 | 0 | |
| 37 | 근 | 0.959 | 근 | 0 | |
| 38 | 근 | 0.964 | 근 | 0 | |
| 41 | 근 | 0.943 | 원 | | |
| 47 | 근 | 0.954 | 근 | 0 | |
| 55 | 근 | 0.931 | 원 | | |

※ AFLP 근연계수 범위 : 0.929~0.964

나) CMS 13M-33-3과 13-65 계통(A형)의 반복친 유사계통 선발

결구력이 약한 A형 배추 CMS 13M-33-3은 F₁에서 AFLP상 근연으로 선발된 한 개체의 후대(과종번호 06CMS-239)와 원연관계로 선발된 다른 한 개체의 후대(과종번호 06CMS-240)BC₁F₁을 과종하였는데 정식된 개체수가 33주와 58주였다. 그런데 포장에서의 육안검정에서는 두 계통의 고정도가 유사하여 구별하기가 어려웠다. 이 계통들은 여교잡 초기세대임으로 모든 개체를 대상으로 AFLP를 수행하고 육안선발된 것과 그 유사도를 비교코자 하였다.

먼저 근연개체 유래의 33주를 AFLP한 결과가 **그림 1-29**이며 육안으로 근연개체 6주와 원연개체 4주 등 선발된 10주의 AFLP 유사도를 나타낸 것이 **표 1-15**이다.

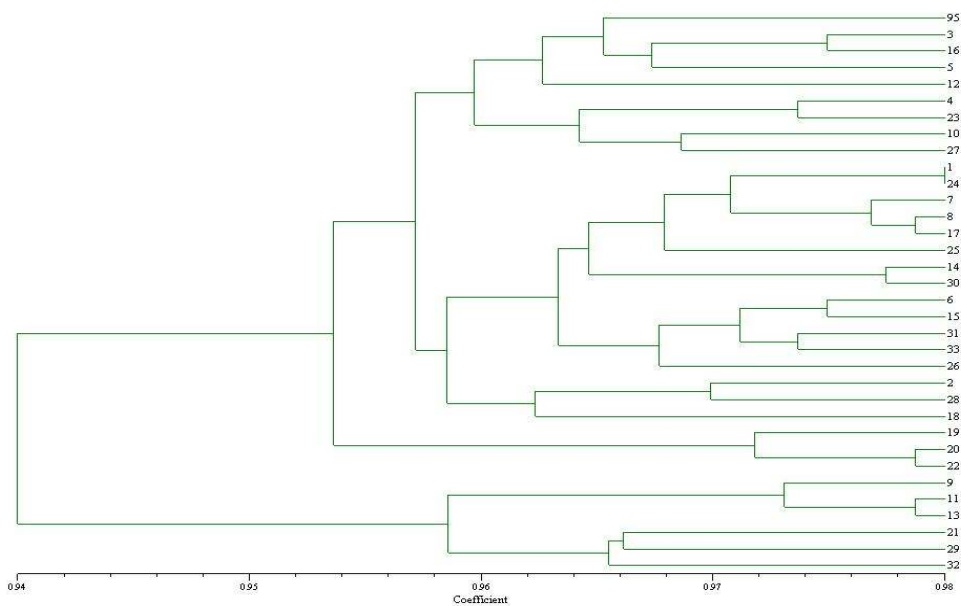


그림 1-29. CMS 13M-33-3계통의 근연개체 유래 BC₁F₁ 세대에 나타난 반복친과의 근·원 관계(95 : 반복친)

전체적으로 AFLP의 유사도가 0.916~0.968로 그 범위가 비교적 큰 것으로 나타났다. 즉 아직 고정도가 덜 된 것으로 간주할 수 있다고 생각되었다. 다음 눈으로 보아 반복친에 가깝다고 생각되어 선발한 6개체 중 2개체의 AFLP 근연계수가 0.936과 0.937로써 다른 개체들보다 비교적 낮게 나타났다. 그리고 육안으로 거리가 멀다고 생각하였던 4개체 중 역시 2개체가 0.965와 0.968로써 수치상으로 아주 가깝게 나타났다. 그리하여 다음 대에서 어떻게 나타날지를 알아보코자 육안검정과 AFLP 근연계수가 일치되는 3개체(6, 18, 22번)와 일치하지 않는 3개체(14, 19, 26번)를 선발하였다.

표 1-15. CMS 13M-33-3계통의 근연개체 유래 BC₁F₁ 세대에서 육안으로 선발된 10개체의 AFLP상 근연계수

| 개체번호 | 육안검정 | AFLP | | | 선발 주 | 비교 |
|--------------|----------|--------------|----------|-----------|----------|----|
| | | 근연계수 | 근, 원 | 근연순위 | | |
| 239-2 | 원 | 0.945 | 근 | 20 | 0 | |
| 14 | " | 0.965 | 근 | 4 | | |
| 16 | " | 0.968 | 근 | 1 | | |
| 32 | " | 0.927 | 원 | 26 | 0 | |
| 6 | 근 | 0.965 | 근 | 5 | | |
| 11 | " | 0.959 | 근 | 12 | 0 | |
| 18 | " | 0.963 | 근 | 7 | 0 | |
| 19 | " | 0.937 | 원 | 21 | 0 | |
| 22 | " | 0.962 | 근 | 8 | 0 | |
| 26 | " | 0.936 | 원 | 22 | | |

※ AFLP 근연계수 범위(33주) : 0.916~0.968

원연개체 유래의 58주에 대해서도 같은 방법으로 육안선발과 AFLP를 수행하였다. 그 결과가 그림 1-30와 표 1-16이다. 이 집단은 AFLP상 원연개체에서 유래된 후대인데 눈으로 보았을 때는 근연개체 유래의 것과 차이가 없었다. 그런데 AFLP의 근연계수는 그 범위가 0.929~0.978로 근연개체 유래집단보다 더 반복친에 가깝게 나타났다.

이 집단에서 육안으로 선발된 근연개체 7주와 원연개체 3주는 모두 AFLP상의 근연계수와 비교적 잘 일치하였다. 다만 전체 58개체 중 육안 선발된 5주가 AFLP 근연계수의 서열상 6~11에 위치하였을 뿐 1~5위까지의 개체는 육안으로 선발되지 않았던 것이다. 그리하여 AFLP상 근연계수 1, 2위(21, 41번)와 육안검정에서 근연으로 선발되어 AFLP상 근연순위가 6, 9, 35위(54, 5, 27번), 그리고 원연개체 한 개체(43번)를 후대채종용으로 선발하였다.

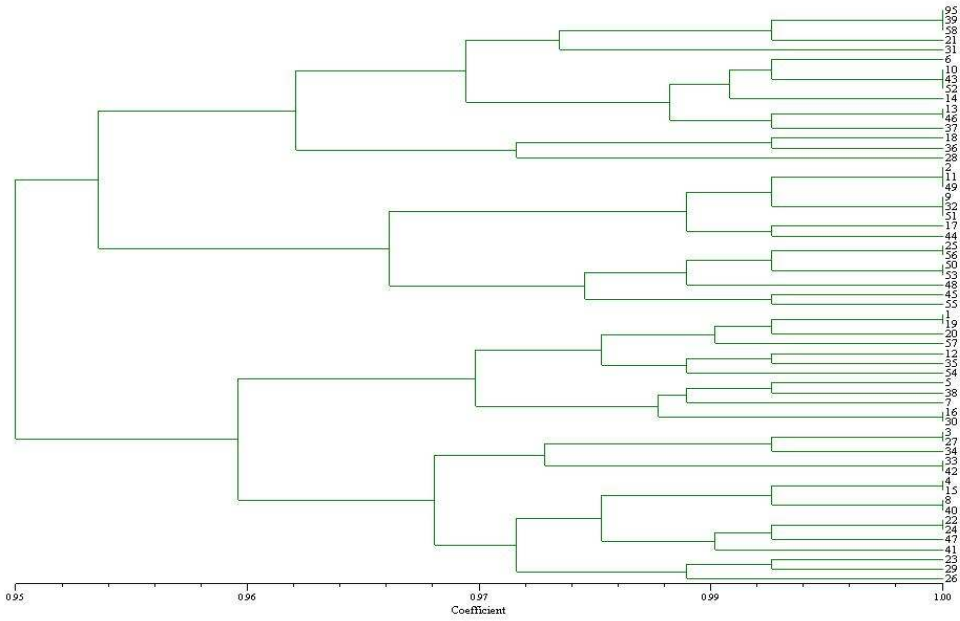


그림 1-30. CMS 13M-33-3 계통의 원연개체 유래 BC₁F₁ 집단의 AFLP dendrogram (95 : 반복친)

표 1-16. CMS 13M-33-3 계통의 원연개체 유래 집단에서 선발된 육안검정과 AFLP 근연관계 계수

| 개체번호 | 육안검정 | AFLP | | | 선발주 | 비고 |
|--------|------|-------|------|-----------|-----|----|
| | | 근연계수 | 근, 원 | 근연순위 | | |
| 240-29 | 원 | 0.950 | 원 | 40 | | |
| 42 | 원 | 0.937 | 원 | 57 | 0 | |
| 43 | 원 | 0.929 | 원 | 58 | | |
| 1 | 근 | 0.961 | 근 | 18 | 0 | |
| 5 | 근 | 0.965 | 근 | 90 | 0 | |
| 27 | 근 | 0.954 | 근 | 35 | | |
| 31 | 근 | 0.963 | 근 | 11 | 0 | |
| 40 | 근 | 0.965 | 근 | 8 | 0 | |
| 54 | 근 | 0.966 | 근 | 6 | | |
| 57 | 근 | 0.965 | 근 | 10 | | |
| 21 | - | 0.978 | - | 1 | 0 | |
| 41 | - | 0.975 | - | 2 | 0 | |

앞의 CMS 3M-33-3번 계통과 마찬가지로 결구력이 약해서 A형으로 분류되는 CMS 13M-65번 계통도 근연개체 유래와 원연개체 유래의 두 계통에 대하여 조사를 하였다. 먼저 근연개체 유래의 39개체에 대하여 AFLP를 수행하고 육안으로 근연인 것과 원연인 것을 7개체와 3개체를 선발하였다. 그리고 AFLP 근연계수를 비교하였다(그림 1-31. 표 1-17).

이 계통의 경우 육안으로 반복친에 가깝다고 생각되어 선발한 7개체 중 6개체가 AFLP상으로는 가깝지 않게 나타났다. 그리고 원연개체라고 생각되었던 것은 대체로 AFLP상으로도 원연이었다. 이처럼 육안검정과 AFLP 검정의 차이가 심하게 나타나는 계통이 있는데 그 원

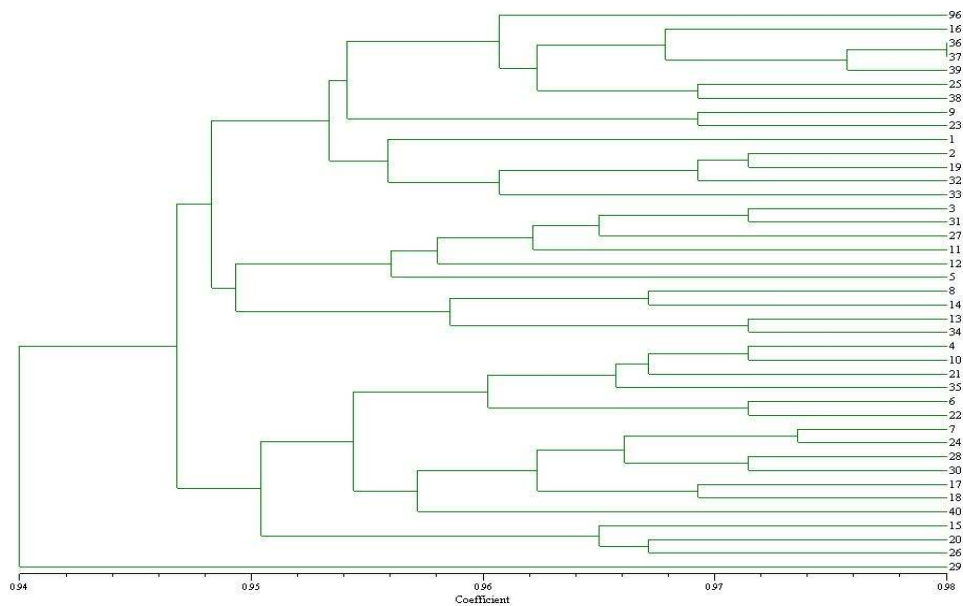


그림 1-31. CMS 13M-65 계통의 근연개체 유래 계통에 대한 AFLP dendrogram(96 : 반복친)

인에 대하여 아직은 어떤 결론을 내리기가 어려운 것 같다. 그리하여 AFLP 근연계수의 순위 1,2위인 36번과 30번 개체, 육안검정과 AFLP 모두 근연이었던 13번 개체, 그리고 육안으로 근연이었으나 AFLP상 원연인 19번과 23번의 2개체 5개체를 후대채종용으로 선발하였다.

원연개체 유래의 경우는 68개체를 육안으로 검정하여 근연개체 6개체, 원연개체 3개체 등 9개체를 먼저 선발하였다. 그리고 이들만으로 AFLP를 수행하였다(그림 1-32). 그 결과 유사도 범위가 0.931~0.966으로 지금까지의 여러 계통에서 나타났던 것과 거의 비슷한 경향이 었다. 다만 원연개체의 유사도가 다소 가깝게 나타나서 육안으로 원연임에도 AFLP상으로는 상당히 고정된 것 같은 수치를 나타내었다(표 1-18). 그리고 비록 전체 개체가 아니고 10주라는 일부만을 육안으로 선발하였지만 이들이 AFLP 유사도와 비교적 잘 일치하고 있음을 보여주었다.

표 1-17. CMS 13M-65 계통의 근연개체 유래집단에서 육안 선발된 개체의 AFLP 근연계수

| 개체번호 | 육안검정 | AFLP | | | 선발주 | 비고 |
|-------|------|--------------|------|-----------|-----|----|
| | | 근연계수 | 근, 원 | 근연순위 | | |
| 242-6 | 원 | 0.944 | 원 | 17 | | |
| 8 | 원 | 0.935 | 원 | 32 | | |
| 17 | 원 | 0.935 | 원 | 33 | | |
| 7 | 근 | 0.935 | 원 | 31 | | |
| 11 | 근 | 0.944 | 원 | 18 | | |
| 13 | 근 | 0.952 | 근 | 10 | 0 | |
| 14 | 근 | 0.937 | 원 | 29 | | |
| 19 | 근 | 0.935 | 원 | 34 | 0 | |
| 21 | 근 | 0.944 | 원 | 21 | | |
| 23 | 근 | 0.929 | 원 | 38 | 0 | |
| 36 | - | 0.965 | - | 1 | 0 | |
| 30 | - | 0.961 | - | 2 | 0 | |

※ AFLP 근연계수 범위(39주) : 0.927~0.965

육안으로 선발된 개체별 AFLP 유사도를 보면 원연개체로 선발된 33번 개체의 AFLP 유사도가 0.953으로 비교적 높고 근연개체로 선발된 62번과 63번 개체의 유사도가 0.935와 0.931로 상당히 낮게 나타났다. 즉 전체 9개체 중 3개체가 육안검정과 AFLP 검정 결과에서 불일치하고 6개체는 대체로 일치하였다. 그리하여 일치하는 근·근 개체 2개와 불일치하는 3개체를 다음 대 채종을 위하여 선발하였다.

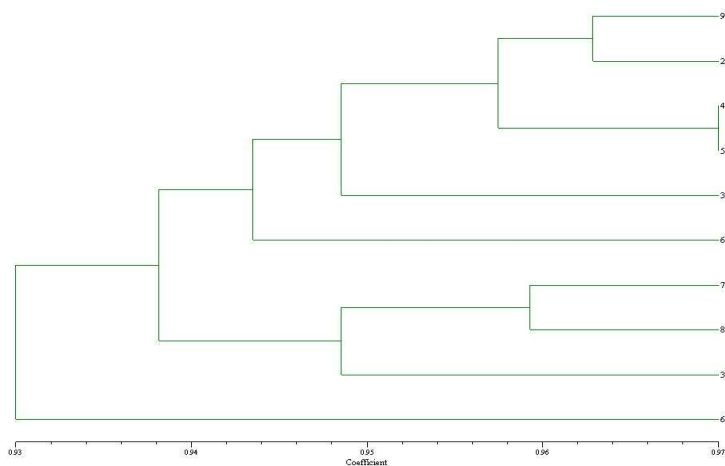


그림 1-32. CMS 13M-65 계통의 원연개체 유래 계통에 대한 AFLP dendrogram

표 1-18. CMS 13M-65 계통의 원연개체 유래 집단에서 육안 선발된 개체의 AFLP 유사도 비교

| 개체번호 | 육안검정 | AFLP | | 선발주 | 비고 |
|-----------|----------|--------------|----------|----------|----|
| | | 근연계수 | 근, 원 | | |
| 243-7 | 원 | 0.935 | 원 | | |
| 33 | 원 | 0.953 | 근 | 0 | |
| 36 | 원 | 0.933 | 원 | | |
| 8 | 근 | 0.961 | 근 | 0 | |
| 25 | 근 | 0.966 | 근 | 0 | |
| 48 | 근 | 0.957 | 근 | | |
| 53 | 근 | 0.957 | 근 | | |
| 62 | 근 | 0.935 | 원 | 0 | |
| 63 | 근 | 0.931 | 원 | 0 | |

※ AFLP 근연계수 범위 : 0.931~0.966

다) 선발 개체의 세대 진전을 위한 후대채종

① 세대 진전과 계통의 고정도

지금까지 복합내병성 CMS 계통을 조기에 육성코자 AFLP에 의한 반복친 유사개체를 선발하였는데 각 세대별 유사도를 보면 표 1-19와 같다. 아직 유사도와 실질적인 고정정도와 상관관계가 확실하지는 않지만 이 연구의 과정에 나타난 결과로서는 0.95 이상이면 1대 잡종 채종에 이용할 수 있을 정도의 고정도를 가진다고 할 수 있지 않을까 한다. 왜냐하면 비록 개체 수는 적지만 BC₃F₁의 경우 육안으로 개체 간 차이를 찾기가 어려웠는데 AFLP 유사도가 0.96~0.98이었기 때문이다. 이러한 가정에 대한 것은 이 과제 의 최종년도인 내년(5차년도)에 시험하여 명확하게 밝히고자 한다.

표 1-19. 여교잡 세대별 AFLP에 의한 유전적 유사도 변이

| 계통 | F ₁ | BC ₁ F ₁ | BC ₂ F ₁ | BC ₃ F ₁ |
|--------|----------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 3M-291 | 0.49-0.99 | 0.56-100 | 0.94-0.98 | 0.96-0.98 |
| 13M-33 | 0.59-0.99 | 0.92-0.98 | - | - |
| 13M-65 | 0.48-0.98 | 0.93-0.97 | | |

② 여교잡 세대의 종자생산성 저하

표 1-20에서 보는 바와 같이 **지난해** 가을에 선발하여 성숙모본으로 월동시킨 후 후대를 채종한 결과 종자 생산량이 극히 저조하였다. 따라서 1차년도 이후의 세대별 종자 생산량을 비

교 검토하였는데 여교잡 세대가 가장 많이 진행된 CMS 3M-291 계통의 경우 세대진전에 따라 여교잡의 종자생산성이 BC₂F₁부터 크게 떨어졌다. 그리고 CMS 계통의 F₁ 종자생산성도 크게 좋지 않았다(표 1-21). 이러한 결과가 **금년도** 가을 시험에 차질을 가져왔다.

표 1-20. KCMS 3M-291 계통의 07년도 종자 생산 현황

| 라벨번호 | 생산 목표 종자 | 종자수/수분화수 |
|-------------------|---|----------------|
| 06CMS-230-13×93-2 | BC ₃ F ₁ 종자 | 7/19 |
| 231 × " | " | 5/38 |
| 232 × " | " | 6/56 |
| 계 | | 18/113 |
| 236 × | BC ₄ F ₁ 종자 | |
| 230 × 95 | BC ₂ F ₁ 이용 F ₁ 종자 | 12/75 |
| × 107 | | 19/79 |
| 계 | | 31/154 |
| 231 × 95 | " | 2/76 |
| × 107 | | 2/70 |
| × 97 | | 0/11 |
| 계 | | 4/157 |
| 232 × 95 | " | 31/91 |
| × 107 | | 8/98 |
| 계 | | 39/189 |
| 236 × 96 | BCF ₃ 이용 F ₁ 종자 | 27/35 |
| × 97 | | 11/37 |
| × 107 | | 1/47 |
| × 108 | | 35/52 |
| × 109 | | 48/59 |
| × 95 | | 0/11 |
| × 111 | | 8/55 |
| × 112 | | 14/78 |
| × 119 | | 37/68 |
| × 262 | | 22/69 |
| × 264 | | 25/63 |
| 계 | | 228/574 |

표 1-21. 3M-291계통(복합내병성)의 BC세대별 종자생산 능력

| 구분 | F ₁ 생산 | BC 생산 | | | 세대별 F ₁ 조합 종자 생산 | |
|-------------|-------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | | BC ₁ F ₁ | BC ₂ F ₁ | BC ₃ F ₁ | BC ₁ F ₁ | BC ₂ F ₁ |
| 수분화수 (A) | 81 | 693 | 1.258 | 174 | 482 | 617 |
| 종자 수 (B) | 42 | 2.211 | 1.276 | 35 | 61 | 173 |
| B/A | 0.5 | 3.2 | 1.0 | 0.2 | 0.1 | 0.3 |

따라서 과거의 채종관련 성적을 검토코자 하였는데 F₁에서 BC₁F₁ 종자 생산량이 비교적 많았던 것을 보았으므로 F₁의 개체별 BC₁F₁ 종자 생산성을 우선 찾아보았다(표 1-22). 여기서 12개체의 종자생산량이 교배 화 당 0.7립에서 9.2립까지 크게 다르게 나타났으며 반복친은 5.7립이었다. 이들 12개체 중 가장 종자 생산성이 높았던 12번 개체(9.2립/교배 꽃)의 후대에서 AFLP상 근연개체라고 하여 선발된 4개체의 BC₂F₁ 종자 생산성을 조사하였다. 그 결과가 표 1-23인데 교배 화 당 종자수가 0.3~1.0립으로 모두 크게 낮았다. AFLP로 반복친에 가장 가까운 개체를 선발한 것인데 왜 반복친보다 종자 생산성이 낮으며 여교잡 세대가 진행될수록 더욱 낮아지는지 현재로서는 잘 이해가 안 된다. 다만 이 CMS가 예상과는 다르게 배추에서 잡종강세가 나타나지 않아 오래전부터 이용하지 못하고 있는 Ogura CMS임이 밝혀졌으므로 여교잡 세대에서 선발여하에 따라 잡종강세는 물론 나타내지 않지만 종자 생산성도 나쁘게 되는 것 밖에는 해석이 안 된다.

CMS 3M-291보다 한세대 늦게 여교잡되고 있는 CMS 13M-33과 CMS 13M-65번 계통의 BC₂F₁ 종자 생산성을 비교해보지 않을 수 없었다. 표 1-24에서 보는바와 같이 CMS 13M-33번 계통은 앞에서 본 CMS 3M-291 계통보다는 덜하지만 역시 종자생산이 크게 낮아져있다.

표 1-22. F₁ 개체 별 BC₁F₁의 종자 생산 능력

| 개체 번호 | AFLP 근연 | 수분화수(A) | 종자 수(B) | B/A |
|-----------|------------|-----------|------------|------------|
| 5 | 근 | 55 | 170 | 3.1 |
| 12 | " | 47 | 434 | 9.2 |
| 15 | " | 68 | 113 | 1.7 |
| 22 | " | 60 | 126 | 2.1 |
| 26 | " | 37 | 24 | 0.7 |
| 60 | 중 | 64 | 347 | 5.4 |
| 86 | " | 52 | 160 | 3.2 |
| 87 | " | 47 | 127 | 2.7 |
| 55 | 원 | 54 | 209 | 3.9 |
| 56 | " | 64 | 110 | 1.7 |
| 88 | " | 85 | 94 | 1.1 |
| 90 | " | 60 | 311 | 5.2 |
| 반복친 | - | 87 | 500 | 5.7 |

표 1-23. 개체번호 12번의 후대(BC₂F₁) 개체별 종자생산

| 개체번호 | AFLP 근연 | 수분화 수(A) | 종자 수(B) | B/A |
|-------|---------|----------|---------|-----|
| 12-19 | | 200 | 193 | 1.0 |
| 12-35 | | 126 | 64 | 0.5 |
| 12-40 | | 46 | 13 | 0.3 |
| 12-50 | | 247 | 245 | 1.0 |
| 계(평균) | | 619 | 515 | 0.8 |

표 1-24. 13M-33-3과 13M-65번 계통의 후대 BC₂F₁과 F₁조합 때의 종자생산량

| 계통 | 교배 구분 | BC ₂ F ₁ 종자 생산 | | | F ₁ 조합 종자 생산 | | |
|--------|----------|--------------------------------------|------------|------------|-------------------------|------------|----------|
| | | 수분화수 (A) | 종자수 (B) | B/A | 수분화수 (A) | 종자수 (B) | B/A |
| 13M-33 | BC | 129 | 157 | 1.2(3.0) | 430 | 995 | 2.3(4.0) |
| 13M-65 | BC | 246 | 1.476 | 6.0 | 326 | 537 | 1.6(8.2) |
| | FC | 67 | 665 | 10.0(16.5) | - | - | - |

() 내는 **최대정자** 생산 화지의 수분화당 종자 수

반면 CMS 13M-65번 계통은 아주 높은 종자생산성을 나타내었다. 특히 개화수분의 경우 교배화당 평균 10립이고 가장 높은 화지의 경우는 16립 이상의 종자 생산성을 나타내었다. 본래 CMS 계통을 증식할 때 자가불화합성 때문에 인공외수분을 하거나(배추, 양배추) 탄산가스 처리를 하는데(주로 무), 이 계통은 자가불화합성이 없어 개화 자가수분이 잘되므로 그만큼 이용 상 편리하고 경제적인 수 있다.

이상에서 반복친의 계통에 따라 여교잡 세대에서 종자생산성이 크게 낮아지는 것이 있는 반면 그렇지 않는 것이 있을 수 있는 것 같다. 이 종자 생산성이 낮아지지 않는 CMS 13M-65번 계통을 앞으로 중점적으로 고정시켜 이용할 수 있도록 추진하여야 할 것 같다.

라) 차세대 진전

봄에 채종된 종자량이 부족하지만 최대한 많은 종자를 가을에 파종하였다. 1차로 세대축진을 위하여 7월4일에 파종하여 저온처리를 하였는데 대부분이 발아하지 않았고 발아한 것도 저온처리 후 이식과정에 고사하고 말았다. 그러므로 남은 종자를 8월 31일 재 파종하였다(표 1-25). 개체수가 적은 KCMS 3M-291 계통은 포장에서 속잎의 황화정도가 다소라도 적은 개체로 07MS-871~4번에서 4개체(BC₂F₁), 07MS-900~5번에서 1, 2, 6번의 3개체(BC₃F₁)를 선발하였다.

KCMS 13M-33-3번 계통(BC₂F₁)은 역시 1차 파종에서 불발아 하거나 죽고 2차에 다시 110립을 파종하였다. 그 중 단지 20주 만이 포장에 정식될 수 있었다. 이들에 대하여 AFLP를 수행한 결과가 그림 1-33인데 반복친과의 근연계수가 0.936-0.963으로 상당히 근연인 것으로 나타났다. 그리고 육안으로 반복친에 가장 가깝고 속잎의 황화정도가 적은 4개체를 선발하였는데 그들의 AFLP의 근연관계 순위가 3, 8, 13, 16위였다. 결국 AFLP상의 근연순위 1위인 12번 개체, 육안선발 주중 근연순위가 가장 높은 3위의 9번 개체와 8위인 20번 개체를 선발하였다(표 1-26).

KCMS 13M-65번 계통은 **전년도**의 선발개체 5주 중 육안으로 근연이었으나 AFLP상으로 원연이었던 62번과 63번 개체에서만 채종이 가능하였다. 따라서 이들을 80립씩 파종하여 33주와 63주를 확보할 수 있었다(표 1-25). 먼저 62번 개체 유래의 07MS-429번계통의 AFLP 성적을 보면 그림 34와 같다. 조사된 모든 개체가 반복친과의 유사성에서 서로 비슷한 것으로 나타났다. 그러나 근연계수를 보면 0.934-0.964로 분포하고 있다. 이 집단 역시 육안으로

앞의 황화정도가 낮으면서 반복친과 보다 유사한 개체 4개를 임의로 선발하였다(표 1-27). 그런데 이 선발된 모든 개체가 AFLP의 근연계수 상으로는 반복친과 원연관계에 있는 것으로 나타났다. 따라서 근연순위가 1위인 18번 개체를 포함하여 육안선발주 중 근연순위가 높은 3개체를 최종적으로 선발하였다.

표 1-25. 07 추작의 공시내용

| 과종 번호 | 전시험 과종번호 | 계통명 | 과종량 | 발아 수 | 비고 |
|----------------|-------------|-------------------------------------|-----|---------|-----------------|
| 07MS- 420~5 | 230, 231 | KCMS-3M-291(6 계통) | 18 | 0 | BC ₃ |
| -871~4 | 631,632 | " (4계통) | 135 | 12 | BC ₂ |
| -900~5 | 917 | " (7계통) | 78 | 15 | BC ₃ |
| 426 | 93-1⊗ | 3M-291-1-1-1-2-1-1⊗ | 10 | 10 | 반복친 |
| 427 | 239-14x95-1 | KCMS13M-33-3-2- 28/2-14/1 | 11 | 0 | |
| 428 | 95-1⊗ | 13M-33-3-1-5-1⊗ | 10 | 8 | 반복친 |
| 429 | 243-62x96-1 | (KCMS3M-291 x13M-65-1)-11/3-62/1 | 80 | 33 | |
| 430 | -63x96-1 | -12 -12/4-63/1 | 80 | 63 | |
| 431 | 96-1⊗ | 13M-65-1-4-1⊗ | 10 | 10 | 반복친 |
| 877 | 637 | KCMS13M-33-3-2- 28/1-28/6 | 110 | 20 | |

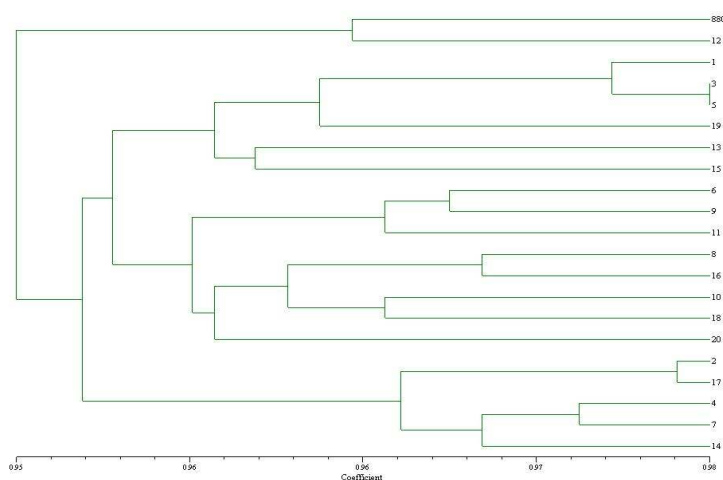


그림 1-33. CMS 13M-33-3계통의 BC₂F₁집단에 대한 AFLP dendrogram

표 1-26. KCMS13M-33-3계통의 BC₂F₁에서 선발된 개체

| 선발개체 번호 | 선발구분 | AFLP 결과 | | | 선발 유무 | 비고 |
|------------|------|---------|------------|-------|-------|----|
| | | 근연계수 | 근, 원 관계 | 근연 순위 | | |
| 07MS-877-9 | 육안 | 0.953 | 근 | 3 | 0 | |
| 11 | " | 0.943 | 원 | 16 | | |
| 14 | " | 0.946 | 원 | 13 | | |
| 20 | " | 0.951 | 근 | 8 | 0 | |
| 12 | AFLP | 0.963 | - | 1 | 0 | |

표 1-27. KCMS 13M-65계통의 BC₂F₁에서 선발된 개체
(62번 개체 유래)

| 선발개체 번호 | 선발구분 | AFLP 결과 | | | 선발 유무 | 비고 |
|-------------|------|---------|------------|-------|-------|----|
| | | 근연계수 | 근, 원 관계 | 근연 순위 | | |
| 07MS-429-12 | 육안 | 0.934 | 원 | 32 | - | |
| 16 | " | 0.948 | " | 17 | 0 | |
| 21 | " | 0.947 | " | 22 | 0 | |
| 31 | " | 0.946 | " | 25 | 0 | |
| 18 | AFLP | 0.964 | - | 1 | 0 | |

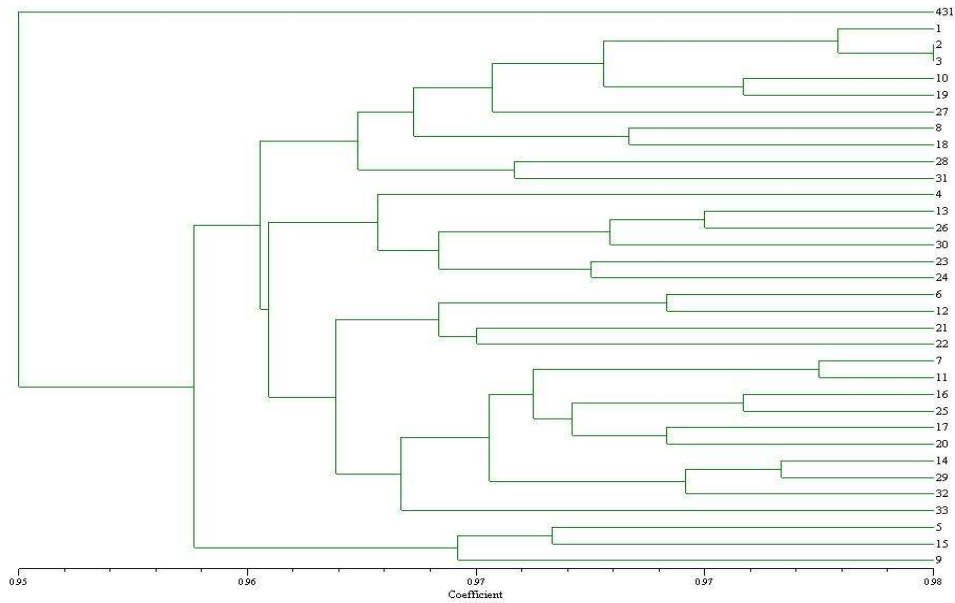


그림 1-34. CMS 13M-65계통의 62번 개체 유래 BC₂F₁집단에 대한 AFLP dendrogram

KCMS 13M-65번의 다른 한 계통 즉 **전년도** 63번 개체 유래의 07MS-430번 계통에 대한 AFLP 결과가 그림 1-35이다. 여기서 반복친 07MS-431번 계통과의 근연계수는 0.913-0.943으로 다른 계통에 비해 상당히 유사도가 낮았다. 그 중 가장 가까운 개체는 4번, 그리고 다음이 42번으로 나타났다. 그런데 육안으로 선발한 4개체는 계수상 근연인 것이 3개, 원연인 것이 1개였다. 그들의 근연계수 순위는 모두 20위 밖으로 상당히 반복친에서 먼 것으로 나타났다(표 1-28). 결국 근연계수 1위인 4번 개체와 육안선발개체 중 근연인 15, 21, 46번 개체를 후대 재종용으로 선발하였다.

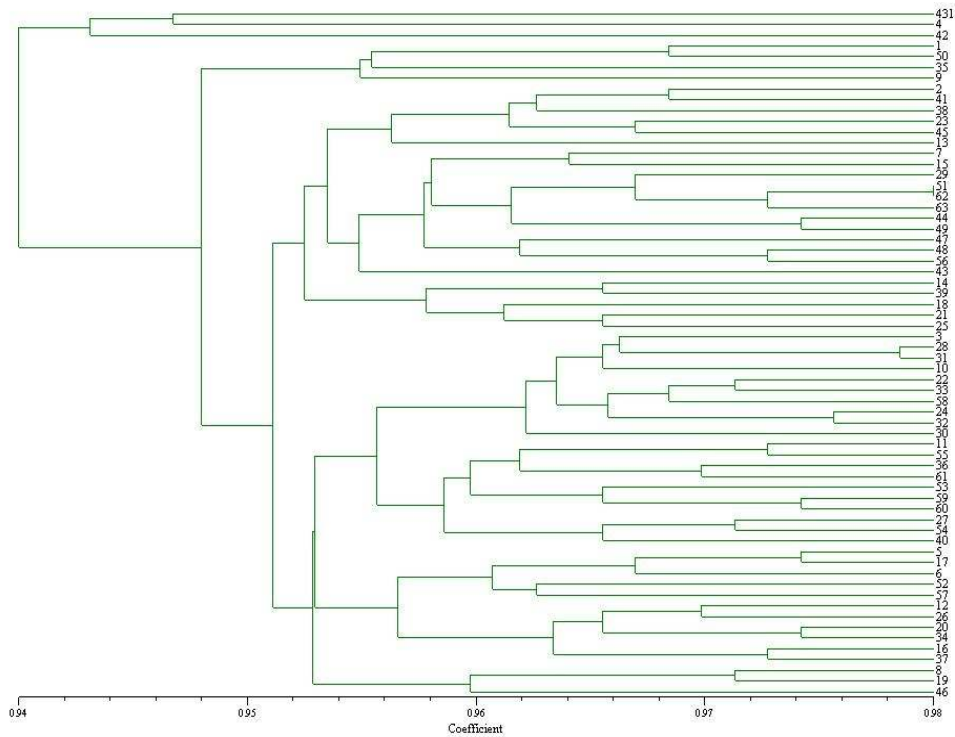


그림 1-35. CMS 13M-65계통의 63번 개체 유래 BC₂F₁ 집단에 대한 AFLP dendrogram

표 1-28. KCMS 13M-65계통의 BC₂F₁에서 선발된 개체
(63번개체 유래)

| 선발개체 번호 | 선발구분 | AFLP 결과 | | | 선발 유무 | 비고 |
|------------|------|---------|------------|-------|-------|----|
| | | 근연계수 | 근, 원 관계 | 근연 순위 | | |
| 07MS-430-1 | 육안 | 0.931 | 근 | 31 | 0 | |
| 5 | | | | | | |
| 21 | | 0.936 | " | 23 | 0 | |
| 46 | | 0.931 | " | 32 | 0 | |
| 62 | " | 0.925 | 원 | 54 | | |
| 4 | AFLP | 0.943 | - | 2 | 0 | |

마) KCMS 3M-291의 BC₃F₁를 이용한 1대잡종(F₁) 성능 검정
 거의 고정된 것으로 판단되는 융성불임성 계통(KCMS 3M-291의 BC₃F₁)과 그의 반복친
 (13M-291)에 우리가 육성하여 보존하고 있는 계통 중 중국 배추에서 유도된 2계통과 기준

재배되고 있는 1대잡종 배추에서 유도된 2계통을 교잡하였다. 비록 종자가 적게 얻어지기는 하였지만 늦여름 재배와 가을 재배의 두 번에 나누어 재배해보기로 하였다. 즉 7월 20일에 파종하여 9월 하순(추석 무렵) 내지는 10월 상순 수확 목적의 늦여름 재배와, 8월 중순에 파종하여 11월 상·중순에 수확하는 겨울 김장용 목적의 가을 재배를 하였다. 단 CMS에 교잡된 조합은 종자가 워낙 적어 가을재배만 하였으며 반복친과의 조합만 두 번에 나누어 재배하였다.

불행히도 4년차에는 8월부터 10월까지 3개월 동안 비 안 오는 날이 거의 없을 정도로 비가 자주오고 따라서 햇볕 나는 날이 너무 적어 배추가 정상적인 생육을 할 수가 없었다. 여름재배에서는 과거에 거의 보지 못했던 각종 병의 발생이 심하여 병사한 계통이 많을 뿐 아니라 병을 이긴 계통이나 F₁ 조합도 속이 차지 못하여 불결구 상태로 외엽만 무성한 것이 많았다. 그런데 시험된 4개 조합 중 3M-291×추1M-5은 병에 걸린 포기가 한 포기도 없었으며 비교적 결구도 양호한 편이었다(표 1-29). 5년차에 다시 한 번 검정해볼 가치가 있는 조합으로 판단되었다.

표 1-29. 배추 CMS-3M-291의 반복친 3M-291계통 이용 조합의 여름 재배 때 특성(7/20파종)

| 파종번호 | 조합 | 잎색 | 속잎색 | 결구형 | 주중(kg) | 구중(kg) | 비고 |
|------------------------|---------------|----|-----|-----|--------|--------|---------|
| 07 F ₁ -491 | 3M-291×추1M-5 | 농녹 | 3.5 | 반결구 | 2.5 | 1.8 | 병해강 |
| 493 | 3M-291×경1M-31 | 농녹 | 3.0 | 반포피 | 2.6 | 1.7 | 탄저병약간 |
| 495 | 3M-291×13M-71 | 녹 | 2.5 | 포합 | - | - | 결구양, 병강 |
| 497 | 3M-291×불1M-68 | 녹 | 4.0 | - | 2.8 | 1.5 | 병강, 극만생 |

속잎색 : 1, 白~5, 황색. 3.5 이상은 보급가능

가을 재배는 비록 비가 자주 많이 오기는 하였지만 대부분의 계통과 F₁ 조합이 병에 걸리지 않고 잘 자랐다. 그러나 역시 일조부족에 의한 광합성량의 부족으로 배추통이 크지 못한 것 같다. 먼저 KCMS의 반복친인 3M-291 계통은 내병성이 아주 강하고 결구성도 비교적 강할 뿐 아니라 중조생으로 유망하게 보였다. 그런데 예년에는 잘 모르고 지나왔었던 석회 결핍증이 다소 발생하고 있었다. 이 특성은 배추의 품질을 크게 떨어트리는 아주 나쁜 것이므로 앞으로 이 계통을 널리 이용할 수 있을지가 의심스러워 졌다. 다른 4계통은 모두 병해에도 강하고 생리장해도 거의 나타나지 않아 좋은 계통으로 간주되었다(표 1-30).

표 1-30. 배추 KCMS-3M-291 계통에 교잡된 조합친의 가을재배 때 특성

| 과중번호 | 친별 | 잎색 | | 주중 (kg) | 구중 (kg) | 병해 | 생리 장해 |
|---------|-------------|----|-----|------------|------------|----|----------|
| | | 겉잎 | 속잎 | | | | |
| 07특-525 | 3M-291(반복친) | 녹 | 3.5 | 1.7 | 0.9 | 강 | 심부증 |
| 537 | 추1M-5(조합친) | 농녹 | 3.0 | 1.5 | 0.9 | 강 | 무 |
| 538 | 경1M-31(") | 농녹 | 3.0 | 1.3 | 0.8 | 강 | 무 |
| 541 | 13M-71(") | 녹 | 3.0 | 1.6 | 1.2 | 강 | 무 |
| 545 | 불1M-68(") | 농녹 | 5.0 | 2.3 | 1.3 | 강 | 무 |

주: 8월 16일 파종. 9월 6일 정식. 11월 12일 조사
일조량 부족과 과습으로 생육 불량

KCMS-3M-291의 BC₃F₁과 그의 반복친에 위의 4계통이 교잡된 1대잡종의 특성을 보면 KCMS 계통에 교잡된 것과 그의 반복친에 교잡된 조합을 구분하기가 어려울 정도로 순도가 좋았다. 즉 CMS 계통이 비교적 잘 고정되었음을 알 수 있었다. 따라서 CMS의 잡종강세 현상을 비교하였는데(표 1-31) 한 조합을 제외한 모든 조합에서 CMS와의 조합은 양친의 평균보다 낮은 잡종강세현상을 나타내었다. 즉 Ogura CMS가 잡종강세현상을 나타내지 못한다는 것이 사실로 입증되었다. 그런데 반복친과의 비교에서는 잡종강세현상이 현저히 떨어지지만 양친의 평균보다는 높은 조합이 있었다. 즉 잡종강세 현상이 없는 것이 아니고 좀 낮은 것이 있었는데 그 조합의 편친이 중국계 배추에서 유도된 계통이었다. 그리고 비록 잡종강세현상은 없었지만 여러 가지 특성에서 상당히 우수한 조합이 있었는데 여름재배에서 우수성을 보였던 바로 그 조합이었다. 즉 이 조합은 여름재배와 가을재배가 가능한 조합임을 알 수 있다.

표 1-31. 배추 CMS-3M-291계통(BC_3F_1)과 반복친에 교잡된 F_1 의 잡종강세

| 과종번호 | F_1 조합 | 주중 (kg) | 구중 (kg) | 잡종강세(%) | | 우수친에 대한 잡종강세(%) | |
|---------------|------------|------------|------------|---------|-----|--------------------|-----|
| | | | | 주중 | 구중 | 주중 | 구중 |
| 07 F_1 -490 | CMSx추1M-5 | 1.4 | 0.9 | 88 | 100 | 82 | 100 |
| 491 | 반복친x " | 2.3 | 1.5 | 144 | 170 | 135 | 100 |
| 492 | CMSx경1M-31 | 1.7 | 1.1 | 113 | 129 | 100 | 122 |
| 493 | 반복친x " | 2.4 | 1.7 | 160 | 200 | 141 | 189 |
| 494 | CMSx13M-71 | 1.2 | 0.7 | 73 | 67 | 71 | 58 |
| 495 | 반복친x " | 2.7 | 1.7 | 164 | 162 | 159 | 142 |
| 496 | CMSx불1M-68 | 2.0 | 1.0 | 100 | 91 | 87 | 77 |
| 497 | 반복친x " | 2.6 | 1.8 | 130 | 164 | 113 | 139 |

주: 8월 16일 파종. 9월 6일 정식. 11월 12일 조사
일조량 부족과 과습으로 생육 불량

한편 KCMS의 응성불임성을 이용할 경우는 잡종강세현상이 없어 이용이 어렵지만 그 반복친을 이용한 1대잡종 중에는 석회결핍증이 나타나지 않고 여러 가지 병해에도 강한 조합이 있었다. 이 조합은 다시 한 번 더 검정해본 후 농가에 보급할 수 있을지도 모른다.

5) 5년차

가) KCMS3M-291 계통 이용 연구

① 종자생산성

4년차까지의 CMS 계통 조기고정을 위한 연구결과 BC_3F_1 이면 육안으로 F_1 을 구분할 수 없을 뿐 아니라 AFLP에 의한 근연 계수도 0.96~0.98로서 반복친과 거의 일치하는 것으로 나타났다. 그런데 계통 고정을 위한 여교잡 과정에서 세대가 진행될수록 종자생산성이 크게 낮아져서 BC_3F_1 의 종자생산성이 교배화당 0.2립(반복친의 경우 약 7~8립)밖에 안 되며 F_1 종자생산도 BC_2F_1 을 이용하였을 경우 0.3립밖에 되지 않았다. 따라서 이 CMS를 이용한 1대잡종의 성능검정도 종자량이 부족하여 가을재배 한 철밖에 할 수가 없었다. 그런데 공시된 4개의 F_1 조합 모두 예상하였던 것과 같이 모두 재배상 지장이 없을 정도로 순도가 균일하였다.

5차 년도에는 여교잡 종자가 적은 이유도 있었지만 이미 순도는 고정되었다고 간주할 수 있었으므로 균일성 검정은 생략하였다. 그리고 다시 BC_2 와 BC_3 계통의 종자 생산성을 재검정하고 F_1 의 성능도 재검토코자 하였다. BC_2 는 F_1 때에 서로 다른 개체에서 유래된 두 계통을 공시하였는데 그 중 한 계통은 4년차에 공시되었던 것이고 다른 한 계통은 여기 공시된 BC_3 의 선대에 해당하는 것이었다. 즉 BC_1 에서 둘로 나누어져 각기 여교잡으로 BC_2 를 생산하였는데 한 계통은 BC_3 생산에 이용되고 다른 한 계통은 반복친과의 유사성이 다소 멀

어서 그대로 보존되었다가 이번에 공시되었던 것이다. BC₃는 이미 앞에서 언급하였지만 역시 4년차에 공시되었던 것이다. 이들 3계통을 모두 동일한 반복친으로 여교잡 하는 한편 몇몇 우량시 되는 계통과 F₁조합 작성에 이용하였다.

교배 결과(표 1-32)여교잡의 경우 BC₂의 한 계통과 BC₃계통은 4년차와 동일하게 종자생산성이 교배 화 당 0.3립으로 극히 저조하였다. BC₂의 다른 한 계통은 교배모본 3주 중 한주만 여교잡에 이용하고 다른 두 주는 F₁조합 작성에 이용하였는데 여교잡의 결과 뜻밖에도 종자생산성이 반복친의 자가수분과 동일할 정도로 높게 나타났다.

표 1-32. KCMS 3M-291 계통의 여교잡 종자 생산성(인공벼수분)

| 과종번호 | 계통명 | 세대 | 수분화 수(A) | 종자 수(B) | B/A |
|------------|----------------------|----------------------------------|----------|---------|-----|
| 07MS-871-1 | KCMS3M-291/12/19/11 | BC ₂ →BC ₃ | 43 | 13 | 0.3 |
| 874-5 | KCMS3M-291/15/39/2 | " | 95 | 737 | 7.8 |
| 900-1 | KCMS3M-291/15/13/1 | BC ₃ →BC ₄ | 32 | 10 | 0.3 |
| 반복친 | 3M-291-1-1-1-1-2-2-1 | - | | | |

이 소송채 CMS의 경우 4년차까지의 결과에서 웅성불임계통의 증식이 어려워 비록 우수한 F₁이 육성되더라도 이용할 수 없을 것 같은 생각을 하였었는데 계통에 따라 종자가 잘 생산되는 것을 육성할 수 있다는 가능성을 보게 된 것이다. 지금까지는 육안 또는 분자생물학적인 AFLP방법으로 반복친과 근연인 소수의 개체 선발에만 치중한 결과 종자생산성이 높은 개체가 제외되었던 것이 아닌가 하는 생각이다. 즉 반복친에 근연인 개체만 선발하는 것이 아니고 근연이면서도 종자생산성이 높은 개체를 선발한다는 개념을 가지고 좀 더 많은 근연개체를 선발한 후 그들 중 종자가 잘 달리는 개체를 2차로 선발하는 체계가 필요하였던 것 같다. 본 과제가 종결되기 전에 이와 같은 결과를 얻어 훌륭하게 1대잡종 종자 생산에 이용 가능한 웅성불임성 계통이 육성되지 못하여 아쉬움이 남는다. 그러나 아직도 우리나라에는 웅성불임성을 이용한 배추의 1대잡종이 육성되지 못하고 있으므로 이 과제에서 얻어진 이러한 결과를 이용하여 가까운 앞날에 좋은 웅성불임성 계통을 육성해 가고자 한다.

1대잡종 채종의 경우 4년차에는 BC₂와 BC₃의 어느 계통이나 그리고 11개 부계 어느 것을 막론하고 1대잡종의 종자 생산성이 교배화당 1립 이하로 아주 낮았었다(표 1-20). 앞에서 본 바와 같이 웅성불임계통의 증식도 잘 안되면서 1대잡종 종자마저 적게 생산된다면 이 웅성불임성은 쓸모가 없을 것으로 생각되었었다. 그런데 금년에는 CMS 3계통의 3개체가 1~2립의 낮은 종자생산을 보였지만 남은 BC₂의 2계통 4개체와 BC₃의 2계통이 실용상 가능성이 있을 정도의 높은 종자 생산성을 보였다(표 1-33).

표 1-33. KCMS 3M-291 계통의 1대잡종 종자 생산성(인공개화 수분).

단위 : 교배 화당 종자수

| 과종번호 | 세대 | 부계(07MS-) | | | | | | | |
|------------|-----------------|-----------|------|------|-----|------|-----|-----|-----|
| | | 533 | 534 | 537 | 549 | 452 | 964 | 559 | 542 |
| 07MS-871-1 | BC ₂ | 11.0 | 11.0 | 11.0 | 4.9 | 4.0 | 4.9 | - | - |
| -2 | " | 8.4 | - | 4.8 | - | 4.6 | - | 9.7 | |
| -3 | " | - | 12.7 | - | 6.2 | - | 6.2 | - | - |
| 872-2 | " | 1.4 | - | 1.9 | - | - | - | 2.6 | 1.7 |
| 873-1 | " | - | 1.9 | - | 0.2 | - | - | - | - |
| 874-2 | " | 16.1 | - | 24.1 | - | 19.2 | - | - | - |
| -3 | " | - | 1.5 | - | 1.7 | - | 1.2 | - | - |
| 900-1 | BC ₃ | 4.2 | 5.4 | 4.8 | 6.6 | 4.6 | 5.5 | - | - |
| -2 | " | - | - | - | - | 4.8 | - | - | - |
| -6 | " | 5.8 | 1.8 | 6.6 | 5.9 | - | - | - | - |

‘주’ 07MS-533 : 태2M-11 : 중국배추 F₁의 소포자 유래 계통
 534 : 태2M-16 : 중국배추 F₁의 소포자 유래 계통
 537 : 추1M-5 : 중국배추 F₁의 소포자 유래 계통
 549 : PMS-218-2 : 외래 계통
 452 : 태2M-21 : 중국배추 F₁의 소포자 유래 계통
 964 : 불1M-68 국내 우수 F₁의 소포자 유래 계통
 559 : 추7M-2 : 중국배추 F₁의 소포자 유래 계통
 542 : 3M-8 : 바이러스병과 뿌리혹병의 복합 내병성 계통

특히 여교잡 종자가 다량으로 생산된 계통의 한 개체는 교배화 당 16립 이상의 아주 많은 종자를 생산하였다. 따라서 역시 응성불임성을 유도하기위한 여교잡 과정에 개체 선발을 잘 하면 교잡종자가 많이 생기는 계통도 육성할 수 있음을 알 수 있다. 여기서 여교잡 종자가 잘 열리는 것이 교잡종자도 잘 열릴 것으로 생각됨으로 여교잡종자가 잘 생기는 개체를 유의해서 선발하면 좋은 응성불임성 계통이 육성될 수 있을 것으로 생각된다.

② 계통 및 1대잡종의 성능

여교잡 3세대의 응성불임성 계통은 고정정도가 이미 F₁ 조합에 이용 가능할 정도로 반복친과 유사하지만 외관상으로는 속잎이 황색을 띠고 세력이 약한 문제점이 있다. 이러한 현상이 F₁ 조합에도 그대로 전해져서 잡종강세현상이 약한 것으로 나타나고 있다(표 1-34). 즉 반복친과의 조합에 비해 응성불임성 계통과의 조합이 주중에 있어서 55-85%밖에 안 되고 있다. 본래 무의 Ogura CMS를 도입한 배추의 응성불임성 계통이 오래전부터 연구되었으나 이렇게 미약한 잡종강세 현상을 극복하지 못하여 지금까지 이용되지 못하고 있는 것이

다. 그런데 이 소송채 CMS도 앞에서 본 바와 같이 Ogura CMS와 동일한 응성불임성 유전자를 가지고 있으므로 역시 잡종강세 현상이 약할 것으로 짐작은 하였지만 4년차에 이어 5년차에도 역시 약하게 나타나고 있다.

이러한 현상에 대하여 종자생산성의 경우와 마찬가지로 계통에 따라 크게 다를 가능성이 있다고 생각된다. 따라서 이 과제가 종료된 후에도 다양한 계통을 응성불임성으로 유도하는 한편 F₁ 조합친으로 이용하여 우량 F₁ 조합을 육성토록 계속 연구할 계획이다.

표 1-34. KCMS 3M-291 계통과 그 반복친과의 F₁의 주중/구중 비교

| 과종번호 | 계통명 | 속잎 색 | 주중 (kg) | 구중 (kg) | MS조합/ 반복친조합 |
|----------|---------------------------------------|---------|------------|------------|----------------|
| 08MS-124 | KCMS 3M-291/12/19/1(BC ₃) | 4.0 | 1.0 | 0.7 | 71 |
| 125 | (반복친 A)3M-291-1-2-1-1(⊗) | 4.0 | 1.4 | 1.3 | 100 |
| 163 | KCMS 3M-291/15/39/2(BC ₃) | 4.0 | 1.4 | 0.4 | 82 |
| 164 | (반복친 B)3M-291-1-2-11-2(⊗) | 4.0 | 1.7 | 1.0 | 100 |
| 126 | KCMS 3M-291/12/19x07MS-533 | 4.0 | 3.0 | 1.2 | 55 |
| 127 | KCMS 3M-291/15/39x " | 4.5 | 4.7 | 2.3 | 85 |
| 128 | 반복친 A x 07MS-533 | 4.0 | 5.5 | 2.9 | 100 |
| 129 | 07MS-533(태2M-11) | 2.0 | 2.4 | 2.0 | - |
| 132 | KCMS 3M-291/12/19x07MS-537 | 3.5 | 2.5 | 1.4 | 64 |
| 133 | KCMS 3M-291/15/39x " | 4.0 | 3.2 | 2.1 | 83 |
| 134 | 반복친 A x 07MS-537 | 4.0 | 3.9 | 3.9 | 100 |
| 135 | 07MS-537(추1M-5) | 3.5 | 3.0 | 2.7 | - |
| 136 | KCMS 3M-291/12/19x07MS-549 | 4.5 | 3.5 | 1.6 | 78 |
| 137 | 반복친 A x 07MS-549 | 4.0 | 4.5 | 3.5 | 100 |
| 138 | 07MS-549(PMS-218-2) | 4.5 | 2.5 | 1.5 | |
| 139 | KCMS 3M-291/12/19x07MS-452 | 3.5 | 2.7 | 1.6 | 69 |
| 140 | KCMS 3M-291/15/39x " | 4.0 | 3.1 | 1.4 | 80 |
| 141 | 반복친 A x 07MS-452 | 3.5 | 3.9 | 2.2 | 100 |
| 142 | 07MS-452(태2M-21) | - | 1.3 | 0.7 | - |

나) KCMS13M-65 계통 이용 연구

①종자 생산성

4차년도에는 KCMS3M-291외에 KCMS13M-33계통과 KCMS13M-65번 계통의 반복친 유사 개체에 대하여 여교잡을 실시하였다. 그 결과 KCMS13M-33계통은 KCMS3M-291번 계통과 마찬가지로 종자 생산성이 아주 저조하였다. 따라서 5년차에는 이 계통을 제외하고 자가화합성으로 자가수분 때 종자 생산성이 아주 높은 KCMS13M-65번 계통만을 세대 진전 시키도록 하였다. 그런데 근연개체로 선발된 개체들은 성숙모본이 생육 중에 고사하거나 정상적으로 자란 것도 그 후대 종자의 발아율이 낮아 시험을 수행할 수 없었다. 따라서 부득이 원연개체로 선발되었던 두 개체(과종번호 : 07MS-429(KCMS13M-65/11/62)와 07MS-430 (KCMS13M-65/11/63))의 후대를 이용하였다. 이들의 BC₃종자를 생산하기 위한 개화수분의 여교잡에서 종자생산성이 4년차보다는 못하였다(표 1-35). 이는 환경의 차이에서 유래된 것으로 생각되며 그 중에서도 상당히 높은 생산성을 나타내는 개체가 있어 웅성불임성 계통의 유지 증식에는 큰 문제가 없을 것으로 생각된다. 즉 소송채 CMS(Ogura CMS)를 이용한 1대잡종 육성에서 웅성불임성 개체의 종자 생산성은 계통에 따라 다르며 실용상 지장이 없을 정도의 높은 생산성을 가지는 계통육성이 가능함을 알 수 있다.

1대잡종의 균일성과 성능을 검토코자 주요 5계통과 교잡하였다(표 1-36). 그 결과 계통과 개체에 따라 생산량이 다소 다르지만 대체로 높은 수준을 보였다. 즉 계통과 조합에 따라 약간의 차이는 있겠지만 대체로 충분한 종자생산성을 나타내고 있는 것 같다.

표 1-35. KCMS13M-65 계통의 여교잡 종자 생산성
(인공개화수분)

| 과종번호 | 계통명 | 세대 | 수분화 수(A) | 종자 수(B) | B/A |
|-------------|---------------------|----------------------------------|----------|---------|-----|
| 07MS-429-12 | KCMS13M-65/11/62/12 | BC ₂ →BC ₃ | 18 | 79 | 4.4 |
| -16 | /16 | | 21 | 98 | 4.7 |
| 18 | /18 | | 19 | 85 | 4.5 |
| 21 | /21 | | 22 | 16 | 0.7 |
| 31 | /31 | | 19 | 50 | 2.6 |
| 430-3 | KCMS13M-65/11/63/3 | | 21 | 79 | 3.8 |
| -15 | /15 | | 23 | 206 | 9.0 |
| -21 | /21 | | 23 | 113 | 4.9 |
| -46 | /46 | | 23 | 159 | 6.9 |
| -62 | /62 | | 12 | 7 | 0.6 |
| 878-1 | KCMS13M-65-1/12/4 | | 19 | 125 | 6.6 |
| 431-1 | | 반복친 | | | 2.6 |
| 431-2 | | " | | | 5.2 |
| 계 | | | | | |

표 1-36. KCMS13M-65 계통의 F₁ 종자 생산성
(인공 개화 수분)

| 과종번호 | 부계 | | | | |
|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 07MS-533 | 07MS-456 | 07MS-537 | 07MS-549 | 07MS-450 |
| 07MS-429-12 | 15.3 | 16.3 | - | - | - |
| -16 | 9.6 | - | 8.5 | - | - |
| 18 | - | - | 5.8 | 6.2 | - |
| 21 | - | - | - | 2.6 | 5.8 |
| 31 | - | 8.4 | - | - | 3.9 |
| 430-3 | 8.7 | 2.4 | - | - | - |
| -15 | 17.4 | - | 1.4 | - | - |
| -21 | - | - | 3.4 | 8.3 | - |
| -46 | - | - | - | 8.9 | 2.3 |
| -62 | - | 16.7 | - | - | 0.3 |
| 878-1 | 10.9 | - | 5.0 | 8.1 | - |
| 반복친(431-1) | 4.9 | 4.4 | 1.7 | 4.0 | 2.6 |
| 반복친(431-2) | 4.6 | 0 | 6.0 | 6.9 | 11.2 |

07MS-533 : 태2M-11

07MS-456 : VC1-2

07MS-537 : 추1M-5

07MS-549 : PMS 218-2

07MS-450 : 3M-302

② 근연개체 선발

KCMS13M-65/12/63 번 계통에서 반복친에 가장 가까운 개체 3번 유래의 BC₃F₁ 집단은 세대를 축진할 목적으로 조기에 과종하고 발아 후 15일경 된 어린 묘를 45일간 저온처리 하였다. 저온처리 중에 어린잎을 따서 반복친에 가까운 개체를 개화하기 전에 선발코자하였다. 지금까지는 AFLP에 의한 근연개체를 선발하였는데 SSR 프라이머를 이용하면 비용이 훨씬 저렴해 진다는 정보가 있었다(캐나다에 있는 Landmark사의 전문가가 원예연구소에서 세미나 발표). 그리고 마침 농촌진흥청의 바이오그린 과제의 배추제염연구팀에서 배추의 SSR마커 230여개를 개발하여 발표한바 있다. 따라서 이 SSR마커를 이용한 반복친과의 근연개체 선발효율을 검토코자 하였다(그림 1-36, 1-37, 표 1-37). SSR 마커는 배추 염색체 10개의 각각에서 10개씩을 선정하여 전체 100개를 이용하였다.

그 결과 먼저 AFLP에 의한 근연지수가 0.29~0.91로서 아주 넓게 분포할 뿐 아니라 반복친과 가장 근연인 개체도 그 지수가 0.91로서 유사성이 크게 떨어지는 것으로 나타났다.

KCMS3M-291의 경우를 볼 때 BC₃ 정도면 그 지수가 0.95 이상으로 나타나야하는데 이러한 현상이 일어나게 된 것은 선대(BC₂)가 반복친과 가장 원연의 것이었고 가장 근연인 4번 개체를 모본으로 이식하는 과정에 근연이 아닌 3번개체로 잘못 이식된 때문인 것 같다. 한 세대가 늦어질 수밖에 없는 큰 실수를 하게 되었다. SSR의 경우는 그 각각의 고유 밴드 수가 적으므로 전체적으로 95개의 프라이머에서 118개의 polymorphic band를 보였는데 이를 근거로 분석한 결과 역시 근연지수가 0.28~0.86으로 넓게 나타났으며 최근연 지수가 0.86으로 AFLP보다 작게 나타났다.

여기서 AFLP와 SSR의 근연지수를 동일하게 비교할 수 있는지는 아직 잘 알 수 없다. 그러나 반복친에 대한 원.근 관계는 어느 정도 일치하여야 할 것으로 이해되는데 그렇지가 못하고 상당한 차이가 있는 것으로 나타났다. 만일 연구를 위하여 근연인 것과 원연인 것을 각각 2주씩 선발한다면 원연인 것은 두 방법이 일치하는 1번과 3번 개체를 쉽게 선발할 수 있다. 그러나 근연인 것은 잘 일치하는 것이 없다. 결국 각각의 방법에서 가장 근연인 것의 후대를 비교해 보기로 하고 방법별로 2주씩을 선발하였다.

그런데 왜 두 방법 간에 이러한 차이가 생기는지에 대하여는 좀 더 연구를 해보아야 하겠지만 SSR 프라이머의 경우 10개의 염색체 각각에서 10개씩의 프라이머를 이용하는데 비해 AFLP는 다형성 밴드가 어떤 염색체의 어떤 부분에 치우쳐 나타나기 때문일지도 모른다는 생각을 하게 된다. 만일 그렇다면 SSR 프라이머를 이용하는 것이 보다 효과적으로 근연개체를 선발할 수 있을지도 모른다.

AFLP 보다 SSR프라이머를 이용하는 것이 비용이 저렴하다는 것은 이번 시험을 통하여 증명할 수 없었다. 앞으로 많은 연구가 필요할 것 같다.

KCMS13M-65/12/63 번 계통에서 선발된 다른 개체의 후대 3개 집단은 집단별로 100개체씩을 재배하고 육안 선발을 하도록 하였다. 그중 15번 개체 유래의 집단은 유묘기에 대부분의 개체가 황화하는 현상을 보여 도태하였다. 그리고 46번 개체 유래의 집단은 상당히 균일성이 높게 보였으나 속잎이 황화하는 개체가 약15% 정도 있었다. 62번 개체는 근연계수가 가장 낮은 것이었는데 그 유래 집단은 역시 균일성이 크게 떨어졌다. 이들 두 집단은 각각 육안으로 근연인 것 2개체씩 선발하였다.

08MS-143 AFLP
 (14 primers, 355 polymorphic bands)

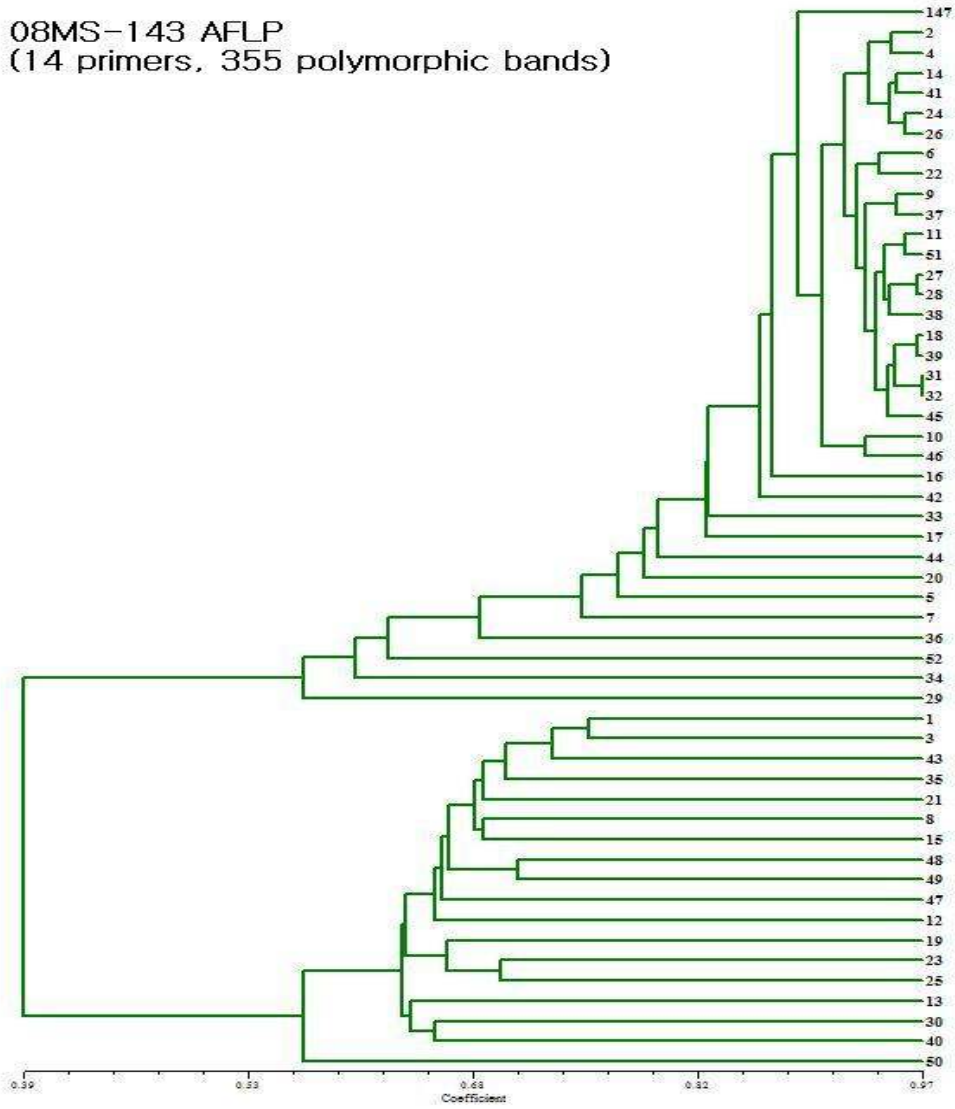


그림 1-36. KCMS13M-65/12/63계통의 3번 개체 유래집단(BC_3F_1)의 AFLP dendrogram

08MS-143 SSR
(95 primers, 118 polymorphic bands)

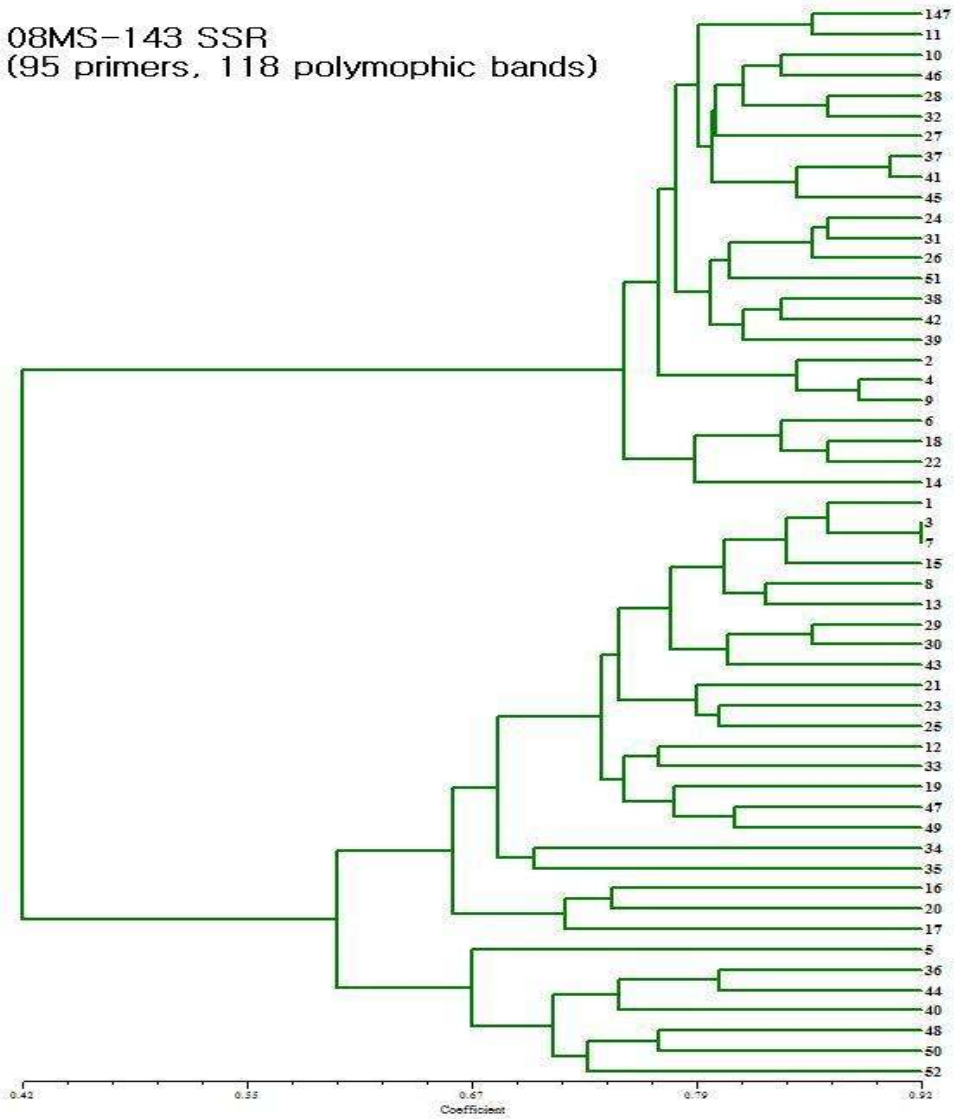


그림 1-37. KCMS13M-65/12/63계통의 3번 개체 유래집단(BC_3F_1)에 대한 SSR 프라이머의 dendrogram

표 1-37. AFLP와 SSR 마커를 이용한 BC₃ 집단의 반복친에 대한 근연관계 비교

| 143AFLP | | | | 143SSR | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 개체 번호 | 근연 지수 | 개체 번호 | 근연 지수 | 개체 번호 | 근연 지수 | 개체 번호 | 근연 지수 |
| 1 | 2901 | 33 | 8028 | 3 | 2797 | 52 | 5678 |
| 3 | 2901 | 17 | 8085 | 1 | 3051 | 48 | 5763 |
| 43 | 3014 | 16 | 8225 | 13 | 3051 | 50 | 5847 |
| 48 | 3296 | 42 | 8254 | 7 | 3136 | 24 | 7288 |
| 8 | 3324 | 46 | 8479 | 25 | 3136 | 31 | 7288 |
| 49 | 3352 | 14 | 8592 | 8 | 3220 | 38 | 7288 |
| 21 | 3493 | 4 | 8620 | 21 | 3559 | 22 | 7327 |
| 35 | 3690 | 24 | 8648 | 30 | 3644 | 37 | 7327 |
| 12 | 3831 | 26 | 8648 | 43 | 3644 | 2 | 7373 |
| 47 | 3972 | 2 | 8704 | 29 | 3729 | 14 | 7373 |
| 15 | 4000 | 9 | 8761 | 35 | 3814 | 26 | 7542 |
| 23 | 4000 | 41 | 8761 | 15 | 3898 | 27 | 7627 |
| 30 | 4056 | 6 | 8845 | 12 | 4068 | 41 | 7627 |
| 13 | 4338 | 10 | 8901 | 34 | 4068 | 10 | 7699 |
| 25 | 4394 | 38 | 8901 | 17 | 4153 | 9 | 7712 |
| 40 | 4761 | 22 | 8958 | 47 | 4153 | 39 | 7712 |
| 19 | 4873 | 31 | 8958 | 23 | 4237 | 32 | 7797 |
| 50 | 5380 | 18 | 8986 | 20 | 4322 | 51 | 7797 |
| 29 | 5803 | 45 | 8986 | 49 | 4322 | 4 | 7881 |
| 34 | 5972 | 11 | 9014 | 19 | 4576 | 6 | 7881 |
| 52 | 6000 | 28 | 9014 | 33 | 4661 | 45 | 7881 |
| 36 | 6704 | 51 | 9014 | 40 | 5000 | 28 | 7966 |
| 7 | 7268 | 27 | 9042 | 5 | 5169 | 42 | 8051 |
| 5 | 7493 | 37 | 9042 | 36 | 5169 | 18 | 8305 |
| 44 | 7606 | 32 | 9070 | 16 | 5339 | 46 | 8390 |
| 20 | 7690 | 39 | 9070 | 44 | 5593 | 11 | 8559 |

③ 계통 및 1대잡종 성능 검정

용성불임계통 3개의 특성을 보면 아직 계통이 고정되지 못하여 속잎 색, 주중, 구중 등이 반복친과 비슷하지 못한 것을 볼 수 있다(표 1-38). 이는 위의 종자 생산성이나 근연개체 선발을 위한 균일성 검정 결과에서 이미 예견되었던 것이다. 다음세대에는 보다 철저한 선발과 모본관리로 균일성이 F₁종자 생산에 지장이 없을 정도로 고정된 계통을 육성토록 유의코자 한다.

표 1-38. KCMS 13M-65 계통(BC₃)의 주중 비교

| 과중번호 | -통명 | 속잎 색 | 주중 (kg) | 구중 (kg) | MS/반복친 |
|----------|---------------------------------------|------|---------|---------|--------|
| 08MS-144 | KCMS13M-65/12/63/15(BC ₃) | 3.0 | 2.0 | 1.2 | 77% |
| 145 | /46(BC ₃) | 3.0 | 3.2 | 1.9 | 123 |
| 146 | /62(BC ₃) | 4.5 | 2.5 | 1.2 | 96 |
| 147 | 반복친. 13M-65-1-4-2-2 | 4.0 | 2.6 | 1.5 | 100 |

이러한 용성불임성 계통과의 F₁조합도 작성하여 검정하였다. 그 결과 역시 용성불임계통과의 F₁조합은 반복친과의 조합에 비해 균일성이 낮고 잡종강세현상이 현저히 낮은 것으로 나타났다(표 1-54). 아직 계통이 덜 고정되었으므로 좀 더 세대가 진행되고 부계로서 중국계의 미칠리 형 또는 직원통 형의 계통이 교잡되어볼 필요가 있을 것 같다.

표 1-39. KCMS 13M-65 계통(BC₂)과의 F₁조합 검정 결과

| 과종번호 | 계통명 | | 순도 | 속잎 색 | 주중 (kg) | 구중 (kg) | MS/ 반복친 |
|----------|----------------|--------|----|---------|------------|------------|------------|
| | 모계 | 부계 | | | | | |
| 08MS-148 | KCMS13M-65-..3 | 태2M-11 | 불양 | 4.0 | 3.6 | 1.1 | 65% |
| 149 | ..15 | " | " | 4.0 | 1.9 | 0.8 | 35 |
| 150 | 반복친 | " | 양 | 4.0 | 5.5 | 1.9 | 100 |
| 151 | ..3 | VC1-2 | 불양 | 4.0 | 2.2 | 1.3 | 85 |
| 152 | ..62 | " | " | 4.0 | 1.9 | 1.1 | 73 |
| 153 | 반복친 | " | 양 | 3.5 | 2.6 | 2.0 | 100 |
| 154 | 부계 VC-1-2 | " | 양 | 3.5 | 1.8 | 1.4 | - |
| 155 | ..15 | 추1M-5 | 불양 | 3.5 | 2.7 | 2.0 | |
| 156 | 반복친 | " | 양 | 4.0 | 3.5 | 2.5 | 100 |
| 157 | ..46 | PMS218 | 불양 | 4.0 | 1.7 | 0.8 | |
| 158 | 반복친 | " | 양 | 4.5 | 2.4 | 2.0 | 100 |
| 159 | ..46 | 3M-302 | 불양 | 4.5 | 2.5 | 1.5 | |
| 160 | ..62 | " | " | 4.5 | 2.6 | 1.8 | |
| 161 | 반복친 | " | 양 | 3.5 | 2.5 | 1.8 | 100 |
| 162 | 부계 3M-302 | " | 양 | 3.5 | 2.0 | 1.5 | - |

나. TuMV 저항성 표지인자 개발

과거에 TuMV-C4의 접종과 ELISA검정을 통해 내병성과 이병성이 구분되었던 DH계통 54개를 과종하였다. 그중 34개는 한 F₁(VCS-3M)에서 유래된 계통으로 내병성과 이병성의 집단을 만들기 위한 것이고 기타 20개는 다른 한 F₁(VCS-13M)에서 유래된 것으로 선발된 표지인자의 계통 검정을 위한 것이었다. 과거의 시험방법과 같이 과종 후 2주정도 자란 어린잎 2장에 접종원을 카보란덤법으로 접종하고 1주일 후에 다시 새로운 잎에 접종하였다. 그리고 4주정도가 경과된 후에 조사하였는데 그 결과가 표 1-40이다.

내병성 계통으로 과종되었던 29계통 중 18계통만 TuMV의 감염증상이 없고 다fms 6계통은 병징이 뚜렷이 나타나 이병성으로 판정되었다. 그리고 5계통은 내병성인지 이병성인지 판단하기가 곤란한 증상을 보였다. 이병성 계통으로 공시되었던 25계통 중 내병성으로 나타난 것은 1계통이었다. 20계통이 이병성이었으며 4계통은 판단이 곤란하였다.

표 1-40. VCS3M 및 13M 유래 계통의 TuMV 접종 결과

| 구 분 | 계통수 | '05년 접종결과 | | | |
|---------|-----|-----------|-----|-----|---|
| | | 내병성 | 이병성 | 불확실 | |
| VCS-3M | 내병성 | 19 | 12 | 4 | 3 |
| | 이병성 | 15 | 0 | 13 | 2 |
| VCS-13M | 내병성 | 10 | 6 | 2 | 2 |
| | 이병성 | 10 | 1 | 7 | 2 |
| 계 | 54 | 19 | 26 | 9 | |

이 결과를 보면 과거의 ELISA검정까지 수행하여 내병성이라고 분류되었던 계통 중 20%가 넘는 6계통이 이병성으로 나타났으며 17%이상인 5계통이 판정 곤란한 것이었다. 반면에 이병성으로 분류되었던 25계통 중 내병성으로 나타난 것은 4%인 한 계통에 불과하였으며 판정이 곤란한 것은 15%인 4계통 이었다. 즉 상당히 많은 계통이 과거에 잘못 판단되었음을 알 수 있으며 특히 병징이 없어 내병성으로 분류된 계통들의 잘못 판단이 컸음을 알 수 있다. 이러한 사실을 더 확대하여 생각하면 이번 시험에서 나타난 결과는 과연 정확한 것인가 하는 의구심이 생기지 않을 수 없다.

VCS3M 유래의 계통 중 이번 접종시험에서 내병성으로 나타난 10계통과 이병성으로 나타난 10계통은 bulk로 하여 즉, 내병성과 이병성의 두 bulk로 AFLP를 수행하였다. 그 결과 그림 1-38에서 보는바와 같이 E-ACC/M-CCA primer에서 내병성 bulk(VR)에 특이 band가 나타났다. 따라서 이 primer 조합으로 bulk를 구성하였던 20 계통 각각에 대하여 AFLP를 수행하였다.

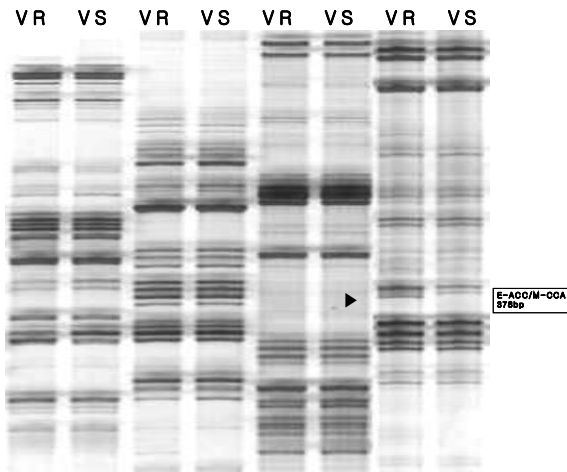


그림 1-38. E-ANN/M-CNN primer 조합의 AFLP band 양상 및 VR 다형성 밴드(화살표).
(VR:내병성 bulk, VS:이병성 bulk)

그 결과 bulk때와 마찬가지로 내병성 계통 쪽에 특이 band가 나타났지만(그림 1-39). 계통번호 22, 256, 291에는 이 특이 band가 나타나지 않았다. 즉 내병성 계통의 경우 접종결과와 완전하게 일치하는 것이 아니었다. 그런데 이병성 계통은 모두 이병성으로 이 밴드가 나타나지 않았다.

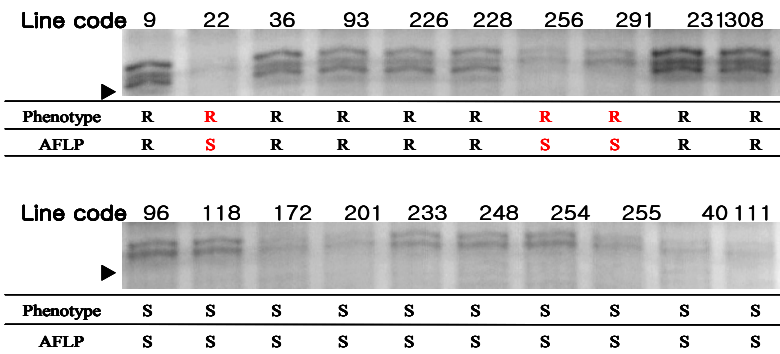


그림 1-39. E-ACC/M-CCA primer 조합의 AFLP band 양상
(R : 저항성, S : 이병성)

나아가 VCS 3M 유래의 모든 계통 즉 bulk에 포함되지 않았던 계통까지 합하여 34계통을 이 primer로 AFLP를 수행하였다(그림 1-40). 그 결과 그림 1-39에 나타난 결과는 정확하게 재현되었으며 bulk에 포함되지 않았던 계통 중 내병성이었던 1계통이 이병성이었고 이병성이었던 7계통은 모두 이병성으로 나타났다. 그리고 판정이 곤란하였던 5계통은 내병성 3, 이병성 2계통으로 구분되었다. 이상의 결과에서 선발된 이 AFLP primer가 내병성과 이병성을 가려낼 수 있는 marker로 이용 가능함을 알 수 있다. 따라서 또 다른 F₁(VCS 13M)유래의 DH계통 20개, 즉 내병성 10개와 이병성 10개를 다시 접종하여 내병성을 검정하는 한편, 이 primer로 AFLP하였다. 그 결과가 그림 1-41인데 표현형 상의 내병성 계통은 10개중 6개였고 이 6계통의 AFLP 결과 1개가 이병성이었다. 그리고 이병성이었던 1계통은 내병성으로 나타났다. 한편 이병성 10계통은 접종결과 한 계통이 내병성이었고 두 계통이 불확실하였는데 AFLP 결과 내병성 계통은 역시 내병성이었고 불확실하였던 4 계통은 내병성 2계통과 이병성 2계통으로 나누어 나타났다. 이러한 결과를 종합하여 정리한 것이 표 1-41인데 여기서 접종 결과를 믿어야 할지 AFLP결과를 믿어야 할지 판단하기가 쉽지 않다. 앞으로 좀 더 깊이 있는 연구가 필요하다고 생각된다.



그림 1-40. VCS-3M집단(저항성 19, 이병성 15계통)의 AFLP band 양상
(R; 저항성, S: 이병성, U: 불확실 계통)

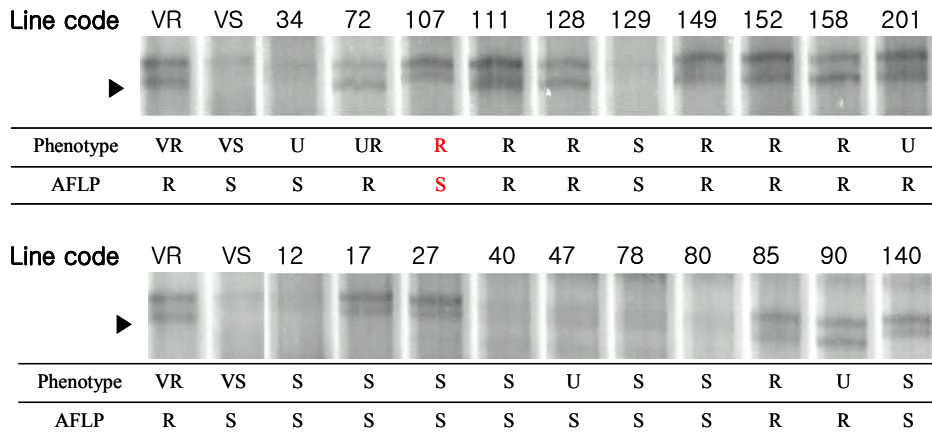


그림 1-41. VCS-13M집단(저항성 10, 이병성 10계통)의 band 양상(R,S,U: 상동)

표 1-41. TuMV-C4 접종결과와 선발 분자 마커간의 계통별 반응 차이

| 표현형 | '01 접종 및 EIISA | '05 접종검정 | AFLP의 R band | | SCAR Band | |
|-----|----------------|----------|--------------|----|-----------|-----|
| | | | 유 | 무 | 내병성 | 이병성 |
| 내병성 | 29 | 19 | 12 | 10 | 12 | 10 |
| 이병성 | 25 | 26 | 2 | 21 | 2 | 21 |
| 불확실 | 0 | 9 | 5 | 4 | 5 | 4 |
| 계 | 54 | 54 | 19 | 35 | 19 | 35 |

그러나 이 AFLP primer로 내병성 계통은 그 수가 적을망정 가려낼 수 있는 primer라고 생각하여 이 특이밴드의 DNA로 Sequence Characterized Amplified Region(SCAR) marker를 design하고자 하였다. AFLP 밴드의 DNA를 sequencing한 결과 378bp의 sequence를 알게 되었다(Bioneer社)(그림 1-42). 이를 바탕으로 7쌍의 primer를 합성하여(Bioneer) 우선 bulk DNA로 검정하였다(표 1-42).

```

1- AAAATNNNNNGGAGCCACTCAGGATATGCTGTTTACNTACTTCATTTC
51- CAACTCAGCATCCTCATGAATCTTGCAAGCAAGGTTTAGATGTGGAACTT
101- CCTTTEGTTTCATTGCTCGTGGTTTGACTCA TCCCCAAATTCGGCGCGACT
      TS-3 left primer
151- ACCGTCGCTTGGCTGAACGCTAGAGATCAACTGGCGTTCGGTATGGCTCC
201- CACGTTGGACTGATTTCCAAACCAATTACGTAATGGTAACCCAAGAACCA
251- TAGCCCATATGAGAGTGTGAAATTAACCTCATGATGCAGATTGGTTTGAT
301- TTATCCATAAAGACTTGTTTTTCCTTTGGAACTCAAATTTTTTTTGGAGAGA
      TS-3 right primer
351- GATGCAATAACTGGAGAGAGGTCANNTT -378bp

```

그림 1-42. 선발된 AFLP band의 sequence와 설계된 SCAR primer(굵은 글씨)

그 결과 표 1-43과 같이 임시번호 Ts-3으로 명명된 primer가 annealing 온도 58과 60℃로 PCR을 30-35cycle로 수행하였을 때 저항성과 이병성 bulk의 각각에 특이 band가 나타났다. 그리하여 각 계통에 대하여 annealing온도를 58℃로 하고 30cycle의 PCR을 수행한 결과 AFLP의 결과와

표 1-42. 공우성 SCAR marker TS-3의 PCR 조건

| Primer | Annealing T _m | PCR cycles | | | |
|--------|--------------------------|------------|----|----|----|
| | | 20 | 25 | 30 | 35 |
| TS-3 | 56 | N | N | N | |
| | 58 | N | | | |
| | 60 | N | | | |

완전히 일치하면서 내병성 계통에는 아주 진한, 그리고 이병성 계통에는 내병성 계통의 진한 band와 동일한 위치에서 희미한 약한 밴드와 함께 어느 정도 뚜렷한 두개의 band가 나타났다(그림 1-43, 1-44, 1-45). 즉 내병성 band와 이병성 band가 모두 나타나는 공우성 marker임이 확인되었다.

표 1-43. TuMV 저항성 연관 SCAR marker 목록

| Primer name | Tm | GC contents (%) | Sequence(5' to 3') |
|-------------|----|-----------------|--|
| TS-1 | F | 59.86 | AGA AGG TGT TTG CCT ACT TCA TTT |
| | R | 60.74 | GAG CCA TAC GAT AGT CCA GTT GAT |
| TS-2 | F | 60.29 | CTC ATG CGA TGA GAT CAA CTA GAC |
| | R | 59.86 | CAG TGT AAC GTT CTC TCT CCA AAA |
| TS-3 | F | 61.48 | ACA CCA AGA ACC AAA GCA TCA TAC |
| | R | 59.88 | TCA TCC ATT CCT AAA GTT GTC AAA |
| TS-4 | F | 61.48 | ACA CCA AGA ACC AAA GCA TCA TAC |
| | R | 60.18 | GCA TCA TGT CCA ATT AAA CAC ACT |
| TS-5 | F | 61.48 | ACA CCA AGA ACC AAA GCA TCA TAC |
| | R | 60.21 | GAT AAA TCA AAC CAA TCT GCA TCA |
| TS-6 | F | 61.67 | TAC TTC ATT TCC CAA CTC AGC ATC |
| | R | 60.18 | GCA TCA TGT CCA ATT AAA CAC ACT |
| TS-7 | F | 61.48 | ACA CCA AGA ACC AAA GCA TCA TAC |
| | R | 60.42 | AAT GGA TAA ATC AAA CCA ATC TGC |

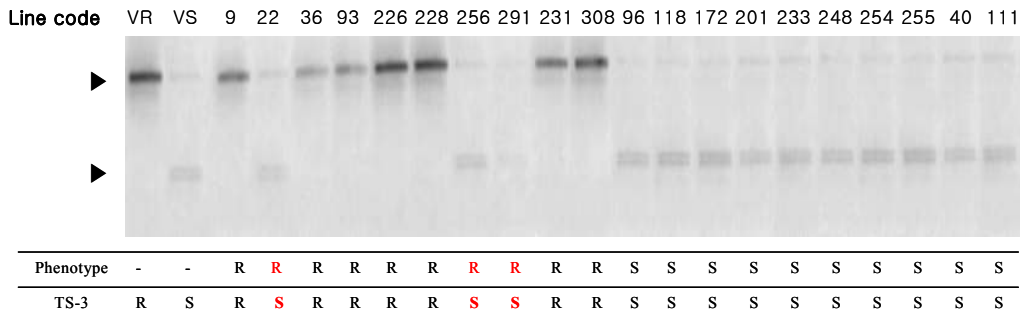
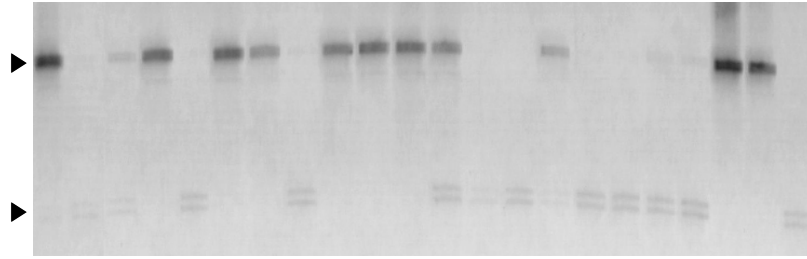


그림 1-43. bulk 구성 계통의 SCAR 마커 검정 결과
위 밴드 : 내병성. 아래 밴드: 이병성



그림 1-44. VCS 3M 집단 SCAR 마커 검정 결과

Line code VR VS 34 72 107 111 128 129 149 152 158 201 12 17 27 40 47 78 80 85 90 140



| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|----|----|---|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Phenotype | VR | VS | U | UR | R | R | R | S | R | R | R | S | S | S | S | S | U | S | S | R | U | S | |
| TS-4-1 | R | S | S | R | S | R | R | S | R | R | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R | S |

그림 1-45. VCS 13M 집단의 SCAR 마커 검정 결과

이 마커를 DH 계통을 만들 때 이용하였던 F₁ 조합의 F₂ 집단에 적용하여 보기로 하였다. 즉 양친, F₁, F₂, 그리고 BCP_R과 BCP_S를 공시하여 식물이 어릴 때에 개체별로 DNA를 추출토록 잎을 sampling하였다. 그리고 다시 식물이 어느 정도 자랐을 때 각 개체별로 어린잎 2장에 카보란덤 법으로 TuMV-C4를 1차로 접종하였다. 한번만의 접종으로는 혹 접종 잘못에 의한 오류가 생길지도 모르기 때문에 1차 접종 후 1주일이 경과될 때 다시 한 번 2차로 접종하였다. 그리고 약 3주가 지날 때부터 병징을 조사하였으며 2차 접종 후 50일정도가 경과될 때까지 식물을 보존하면서 병징 발현을 조사하였다. 이렇게 조사한 결과가 표 1-44이다. 본 시험에 공시된 재료에 있어서 바이러스병 내병성은 단인자 우성으로 간주할 수 있었다. 다만 F₁을 이병성친과 교잡한 BCP_S에서는 내병성 개체와 이병성개체가 1:1로 분리하지 못하고 내병성 개체가 약 21%(1:1 분리 기준 가정에서)정도 많이 나타났다. 이러한 현상이 어떻게 해서 나타났는지 현재로서는 이해가 잘 안되지만 일단 배추의 바이러스병은 단인자 우성에 의해 내병성이 나타나고 열성호모일 때 이병성으로 나타난다고 생각된다. 그러나 내병성 인자의 발현을 조장하거나 이병성 인자의 발현을 억제하는 미동인자가 있는 것으로 가정하였다.

표 1-44. 배추 바이러스병(TuMV-C4) 내병성 유전 양식

| 세 대 | 개체수 | 내병성 개체수 | 이병성 개체수 | 불확실 개체수 | X ² (단인자우성) |
|------------------|-----|------------|------------|------------|---------------------------|
| P _R | 20 | 20 | 0 | 0 | |
| P _S | 48 | 0 | 48 | 0 | |
| F ₁ | 48 | 48 | 0 | 0 | |
| F ₂ | 199 | 145 | 40 | 14 | 1.13 ^{ns} |
| BCP _R | 150 | 150 | 0 | 0 | |
| BCP _S | 198 | 120 | 78 | 2 | 8.91 |

한편 준비된 DNA로 개발된 공우성 SCAR 마커 시험을 수행하였다. 그런데 이 마커는 열성인 이병성 개체의 경우 일부개체에서 우성인 내병성 개체에서 나타나는 마커자리에 아주 희미한 밴드를 가지고 있었다. 이러한 밴드가 내병성과 이병성 계통을 구분하는 데는 별 지장이 없다고 생각하여 F₂집단에 적용하였던 것이다. 그 결과가 표 1-45이다. 먼저 F₂의 분리비를 보면 비록 RR개체수가 다소 많기는 하지만 X²값이 5.30으로 마커의 분리비가 1:2:1에 적합한 것으로 볼 수 있다. 그런데 여교잡 세대에서는 내병성 친과 교잡한 경우 RR과 RS가 1:1이 아니고 RS개체가 더 많이 나타났다. 그리고 이병성 친과 교잡한 경우는 이보다 더 심하여 SS개체보다 50%이상(1:1 분리기준일 때) 이나 많은 RS개체가 구분되었다.

이러한 현상은 이병성 유전자와 연관된 마커 인자와 상당히 먼 거리에 내병성 연관 마커와 분자량이 같은 다른 어떤 인자가 있는 것이 아닌가 하고 추측할 뿐 아직은 어떤 결론도 내릴 수가 없다. 그리하여 집중 후 표현형상으로 나타난 내병성과 이병성 개체별 SCAR 마커의 반응을 조사 정리하였다(표 1-46). 여기서 보면 F₂의 경우 이병성인 개체 46주 중 16주가 그리고 BCP_S의 경우 역시 이병성 개체 중 절반이 SCAR 마커 상 RS로서 나타났다. 그리고 F₂에서 RR개체가 59개체로서 분리비인 1/4의 46개체보다 상당히 많이 나타나있다. 내병성 친과 이병성 친 및 그들 간의 F₁, 그리고 F₁유래의 DH계통에 대하여는 이 SCAR마커가 어느 정도 정확성을 가지는 것 같았으나 F₂나 BCP_S 집단의 검정에서는 그 정확도가 크게 낮아 이용할 수가 없을 것 같았다. 이러한 원인을 알고자 이 SCAR마커로 증폭된 DNA의 sequence를 분석하여 본 결과 transposon 영역의 DNA임이 밝혀진 것이다. 즉 이 마커는 정확성이 낮아서 이용할 수 없을 것으로 결론지을 수밖에 없게 되었다.

표 1-45. 배추 바이러스병(TuMV-C4)의 연관 분자 표지인자에 의한 유전분석

| 세 대 | 개체 수 ^{z1} | | | | 예상 분리비 | X ² 값 (단인자우성) |
|------------------|--------------------|----|-----------------|----|------------|-----------------------------|
| | 검정개체 | RR | RS | SS | | |
| P _R | 8 | 8 | - | - | | |
| P _S | 17 | - | 7 ^{y1} | 10 | | |
| F ₁ | 48 | - | 48 | - | | |
| F ₂ | 183 | 59 | 85 | 39 | 1:2:1(3:1) | 5.30(1.33) |
| BCP _R | 139 | 52 | 87 | - | 1:1 | 8.81 |
| BCP _S | 194 | - | 153 | 41 | 1:1 | 64.66 |

^{z1} RR: 내병성 마커만 있는 개체.

RS: 내병성과 이병성 마커를 함께 가진 개체

SS: 이병성 마커만 있는 개체.

^{y1} 극히 희미한 내병성 관련 마커임

표 1-46. F₂세대의 접종 결과와 SCAR 마커에 의한 검정 결과 비교

| 세대 | 개체 수 | 마커구분 | 내병성개체 (RR1 : RS2) | 이병성 개체 (SS) |
|------------------|------|-------|----------------------|----------------|
| F ₂ | 183 | 접종 결과 | 137 | 46 |
| | | SCAR | 144=59 : 85 | 39 |
| BCP _R | 139 | 접종 결과 | 139 | 0 |
| | | SCAR | 139=52 : 87 | 0 |
| BCP _S | 194 | 접종 결과 | 118 | 76 |
| | | SCAR | 153=0 : 153 | 41 |

그런데 최근에 농촌진흥청 농업생명공학연구원의 배추 genomic 연구팀에서 230여개의 SSR 마커를 개발하였다. 이 마커를 우리 회사와 공동으로 이용하기로 하고 양자 간의 연구재료 활용 협약을 체결하였다. 우선 이 primer를 이용한 SSR marker를 찾고자 하였다.

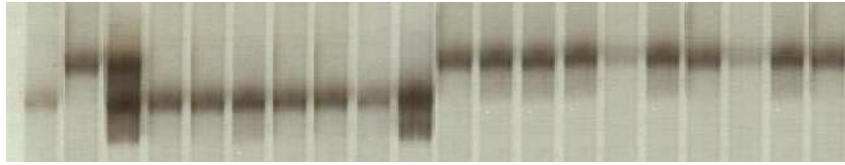
표 1-47에서 보는바와 같이 238개의 SSR primer를 TuMV에 저항성인 순계와 이병성인 순계 각각의 10계통씩으로 만든 집단(VR, VS 집단)에 적용하였다. 그 결과 36개 primer가 내병성과 이병성을 구분하였다. 따라서 이들을 다시 내병성 친, 이병성 친, 그리고 그들 간의 F₁에 적용하여 내병성과 이병성을 잘 구분하고 F₁에서 공우성인 primer를 14개 선별할 수 있었다. 이들을 다시 VR과 VS 집단을 만들었던 20개의 계통에 적용하여 최종적으로 3개의 우수한 공우성 마커를 선정할 수 있었다(그림 1-46, 1-47, 1-48, 1-49).

표 1-47. SSR primer의 검정 및 TuMV 마커로서의 선발 결과

| 검정한 수 | 선발된 마커 수 | | |
|-------|----------|---------------------|------|
| | VR/VS 집단 | 양친 및 F ₁ | 개체검정 |
| 238 | 36 | 14 | 3 |



VR VS VR VS VR VS VR VS VR VS VR VS VR VS VR VS VR VS VR VS VR VS VR VS
 그림 1-46. 배추 바이러스병 내병성 및 이병성 집단에서 나타난 SSR의 KS-TuMV-1,2,3의 밴드



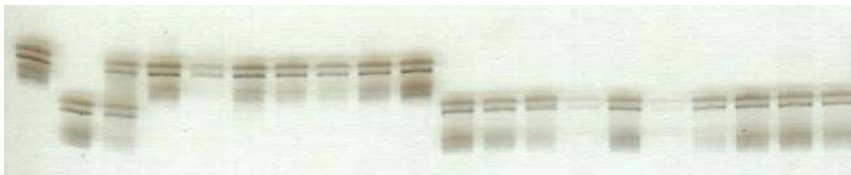
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|----|----|----|---|-----|-----|-----|-----|----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|---|
| Line code | PR | PS | F1 | 9 | 226 | 246 | 288 | 231 | 93 | 260 | 96 | 172 | 201 | 233 | 248 | 254 | 255 | 111 | 118 | 40 | |
| Phenotype | R | S | R | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| Marker | R | S | RS | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |

그림 1-47. 배추 바이러스병 내병성 및 이병성 양친, F₁, 내병성과 이병성 집단을 구성한 순계에서 나타난 SSR의 KS-TuMV-1의 밴드 양상



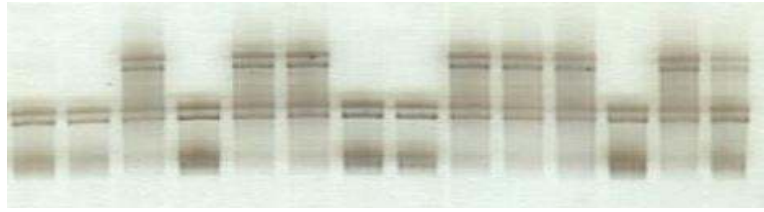
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|----|----|----|---|-----|-----|-----|-----|----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|---|
| Line code | PR | PS | F1 | 9 | 226 | 246 | 288 | 231 | 93 | 260 | 96 | 172 | 201 | 233 | 248 | 254 | 255 | 111 | 118 | 40 | |
| Phenotype | R | S | R | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| Marker | R | S | RS | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |

그림 1-48. 배추 바이러스병 내병성 및 이병성 양친과 F₁ 및 내병성과 이병성 집단을 구성한 순계에서 나타난 SSR의 KS-TuMV-2의 밴드 양상



| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|----|----|----|---|-----|-----|-----|-----|----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|---|
| Line code | PR | PS | F1 | 9 | 226 | 246 | 288 | 231 | 93 | 260 | 96 | 172 | 201 | 233 | 248 | 254 | 255 | 111 | 118 | 40 | |
| Phenotype | R | S | R | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| Marker | R | S | RS | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |

그림 1-49. 배추 바이러스병 내병성 및 이병성 양친과 F₁ 및 내병성과 이병성 집단을 구성한 순계에서 나타난 SSR의 KS-TuMV-3의 밴드 양상



| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|---|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Line code | 4 | 13 | 20 | 47 | 62 | 73 | 109 | 128 | 147 | 156 | 161 | 184 | 189 | 194 |
| Phenotype | S | S | R | S | R | R | S | S | R | R | R | S | R | R |
| Marker | S | S | RS | S | RS | RS | S | S | RS | RS | RS | S | RS | RS |

그림 1-50. 배추 바이러스병 내병성 및 이병성 양친간 F₁에 이병성친을 교잡한 여교잡 집단 of 몇몇 개체에서 나타난 SSR의 KS-TuMV-3의 밴드 양상

나아가 이들의 정확도를 알고자 내병성과 이병성 친 간의 F₁, F₂, BCP_R, BCP_S 집단에 TuMV-C4를 인공접종하는 한편, 선발마커로 내병성과 이병성 개체를 구분하였다. 그 결과 양친 및 F₁에서는 3가지 마커 모두 예외 없이 두 가지 결과가 잘 일치하였다. F₂에서는 접종에서 내병성이었던 개체 중 몇몇 개체가 이병성 마커를 나타내었으며 이병성이었던 개체 중 역시 몇몇 개체가 내병성 마커를 나타내었다. BCP_R 집단에서는 모든 개체가 내병성 반응이었다. 따라서 BCP_S 집단의 접종결과와 마커간의 표현형 차이를 가지고 각 마커별 조환가를 산출하였다(그림 1-51, 표 1-47). 여기서 TuMV 내병성인자와 가장 가깝게 연관되어 있는 마커는 KS-TuMV-3이었으며 조환가는 이병성인자의 내병성 표현이 2.2cM, 내병성 인자의 이병성 표현 1.1cM이었다. 이러한 사실을 염색체상에 나타낸 것이 그림 1-51이다. 이 연관군은 농업생명공학연구소의 배추재조합에서 작성한 유전자연관지도상 배추 유전자의 제 6번 연관군에 속하며 제4번 염색체인 것으로 밝혀졌다.

여기서 이병성이 내병성으로 나타날 확률이 2.2% 연관마커를 실제 배추 육종의 TuMV 내병성 개체 선발에 얼마나 효율적으로 이용할 수 있느냐 하는 것이다. 예를 들어 일반적으로 내병성 개체를 선발할 집단이 F₂이다. TuMV 저항성은 단인자 우성으로 알려져 있으므로 F₂에서는 저항성 호모(RR), 저항성 헤테로(RS), 이병성 호모(SS)가 1:2:1로 섞여있게 된다. 그런데 2.2cM은 내병성 호모 RR을 선발할 경우 SS가 선발될 가능성은 거의 없고 RS가 RR로 선발될 가능성이 있는데 그 확률이 S가 R로 바뀔 2.2%의 2/3인 약 1.5% 정도라고 생각할 수 있다. 즉 F₂ 집단 400개체에서 RR개체 100주를 마커로 선발한다면 그 중 1-2개체 정도가 내병성 헤테로인 RS일 가능성이 있다는 것이다. 이 정도의 정확성이라면 거의 걱정 없이 이 마커를 활용할 수 있다고 생각된다. 따라서 이를 특허신청하는 한편 마커 개발이 어려운 중소 종묘사들에게 일정 금액의 수수료를 받고 검정해주도록 하였다.

표 1-47. 배추 바이러스병 내병성 및 이병성 양친간 F₁에 이병성친을 교잡한 여교잡 집단의 집중결과와 공우성 선발 SSR마커별 검정 결과 비교

| 집종 및 마커 | 집종결과와 내병성집단의 마커별 개체 수 | | | 집종결과와 이병성 집단의 마커별 개체 수 | | 검정 개체 수 | 조환가(%) (cM) |
|-----------|-----------------------|-----|----|------------------------|----|---------|--------------------|
| | RS | RR | SS | SS | SR | | |
| | 집종 | 109 | - | - | 72 | | |
| KS-TuMV-1 | 105 | 1 | 4 | 67 | 4 | 181 | S→R 2.8 R→S 2.2 |
| KS-TuMV-2 | 108 | 2 | 4 | 59 | 8 | 181 | S→R 5.5 R→S 2.2 |
| KS-TuMV-3 | 107 | 1 | 2 | 68 | 3 | 181 | S→R 2.2 R→S 1.1 |

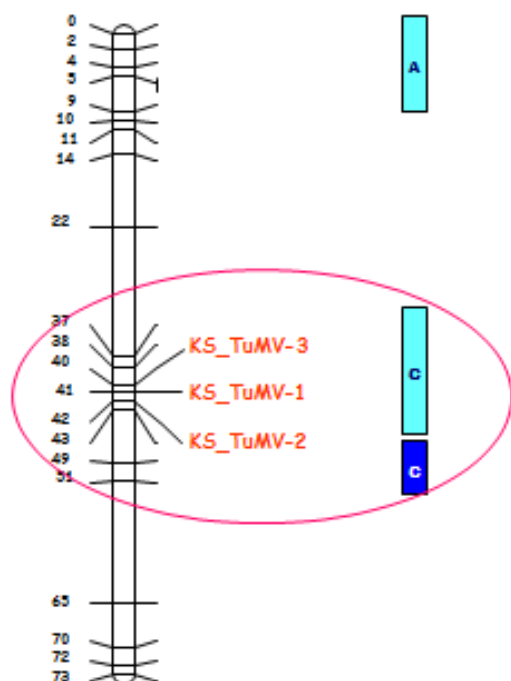


그림 51. 배추 바이러스 TuMV-C4 유전자에 연관된 SSR 분자표지의 염색체상 위치

제2절 Fox-hunting system을 이용한 배추속 작물의 저발현 기능유전자 대량획득 및 육종소재 창성

1. 균질화된 완전장 cDNA 및 FOX-Agrobacterium library 작제

가. 서론

유전자의 기능을 해석하는 방법에는 유전자의 점돌연변이(point mutant)를 도입하거나 삽입 또는 결실 변이를 도입하는 방법이 통상 사용되어지고 있다. 점돌연변이의 삽입에는 게놈 전체를 변이유도시약에 의해 화학적으로 처리하는 방법이 일반적이다. 그러나 이 방법은 변이의 도입은 간단하지만 게놈 DNA를 구성하는 수억의 염기배열 중으로부터 하나의 염기 치환을 검색하지 않으면 안 되고, 그 동정에는 많은 시간과 기술이 요구된다. 따라서 수만 개의 유전자 기능 동정을 단시간에 또는 망라적으로 결정하는 방법으로는 그리 좋은 방법이 아니라고 말할 수 있다.

그리하여 고효율적으로 유전자의 변이를 도입하고 또한 단시간에 유전자 기능을 조사하는 방법으로서 유전자 tagging법이 알려져 있다. 이 방법은 기지의 유전자 단편(tag)을 무작위로 게놈 중에 삽입하고 삽입부위의 유전자 기능을 파괴하는 것이다. 식물의 경우 유전자 tag에는 T-DNA나 transposon이 사용된다(Krysan, 1999; Speulman, 1999). T-DNA경우는 아그로박테리움을 매개로한 식물 감염에 의해, transposon의 경우는 transposase를 가진 식물과의 혼합에 의해 유전자 단편은 게놈 중에 무작위로 삽입된다. 그리고 T-DNA는 통상 하나의 식물 개체당 1~2 copy정도의 빈도로 삽입되고(Azpiroz-Leehen, 1997), 어떤 종의 transposon의 경우는 거의 1 copy의 transposon이 게놈 중에 삽입된다(Fedoroff, 1995). 이와 같이 삽입변이주를 수만 개 준비함으로써 각각 유전자의 기능을 파괴한 식물주의 집단을 작제할 수가 있다.

목적의 변이 형질을 나타내는 식물을 단리한 후에 변이 형질과 유전자와의 관계를 조사하는 경우는 도입한 유전자 단편을 실마리로 PCR 등의 방법에 의해 삽입부위 근방의 유전자 정보를 얻을 수가 있기 때문에 유전자의 기능 동정을 단시간에 또한 망라적으로 행할 수가 있다(Krysan, 1999; Speulman, 1999).

유전자 tagging법의 발전형으로서 activation tagging법이라고 하는 방법이 알려져 있다. Activation tagging법이란 T-DNA내에 끼어들어간 전사의 enhancer배열을 이용하여 T-DNA가 삽입된 게놈의 근방에 존재하는 유전자의 전사 활성화를 일으킨다고 하는 것이나, 근년 새로운 식물 유전자 기능의 해석법으로서 발달하여 왔다(Walden, 1994)

Activation tagging이 갖는 특징 중 가장 중요하다고 생각되는 것은 tag에 의해 우성돌연변이까지도 만들 수가 있다고 하는 성질이다. 즉 다른 유전자가 중복기능을 갖는 tape(예를 들면 gene family를 형성하는 유전자군)의 유전자 변이에 기인하는 표현형까지도 관찰할 수가 있다고 하는 점이다. 이 성질은 종래의 유전자 파괴형의 돌연변이체 작성으로부터는 결코 관찰되지 않았던 것이다.

그러나 이와 같은 activation tagging법을 망라적인 유전자 기능의 해석(게놈내에 존재하는 유전자의 기능을 종합해서 해석하는 일)에 이용하는 데에는 하나의 큰 문제가 있다. 그것은 tag 내부의 activator로써 enhancer 배열이 이용되고 있기 때문에 전사활성화 가능한 게놈 영역은 삽입 후에 전후 5kbp 정도까지 영향한다고 하는 점이다(Weigel, 2000). Arabidopsis와 같은 모델식물에서는 10kbp의 게놈 영역 중에 평균 2개 이상의 유전자가 존

재하기 때문에 enhancer에 의해 어느 유전자가 활성화 되었는가를 판단하는 것이 곤란하다. 따라서 원인유전자의 탐색에는 이들 삽입부위 근방의 유전자를 모두 단리하여 다시 형질전환을 행하고 강제 발현시켜 표현형이 재현하는 것을 확인함에 따라 어떤 유전자가 그 표현형을 규정하기 위하여 기능하고 있는가를 조사하는 것이 불가결하다. 이것은 목적형질을 나타내는 식물의 단리로부터 원인유전자의 탐색까지 평균하여 년 단위의 해석이 필요하다는 것을 의미하고 있다. 따라서 activation tagging법을 망라적인 계놈 유전자 기능 해석에 이용하려고 하면 얻어진 유전자 중이나 표현형의 신규성은 인정될지라도 종래의 유전자 파괴형 타입의 tagging에서 보여 지는 유전자 탐색의 신속성, 망라적 해석의 적응성이라고 하는 장점이 없다고 하는 큰 모순이 있다.

이러한 문제점을 해결하기 위한 방법으로서 완전장 cDNA와 식물 세포내에서 항시적 또는 조건적으로 발현을 유도할 수가 있는 promoter를 포함한 T-DNA vector를 갖는 아그로박테리움을 식물 집단에 도입하고, 상기의 완전장 cDNA를 과잉으로 발현시켜 형질전환된 식물체의 표현형을 확인함으로써 유전자 기능을 망라적으로 해석하는 것이 「완전장 cDNA를 이용한 종합적 유전자 기능 해석의 식물 시스템」이다.

그리고 이러한 해석 방법을 「FOX hunting system」 (Full-length cDNA over expressor gene hunting system)이라고 명명하였다. 이 방법에 이용되는 완전장 cDNA란 mRNA의 완전한 copy를 의미한다. 완전장 cDNA library는 유전자가 기능할 때에 필요한 전아미노산 정보를 포함하기 때문에 도입하는 유전자가 본래 갖고 있는 전기능을 발휘할 수가 있다. 따라서 통상의 cDNA library에 비교하면 기능발현의 효율이 훨씬 높고, 또한 모든 cDNA 단편이 본래의 개시코돈 및 정지코돈 정보를 갖추고 있기 때문에 발현을 위한 단백질 융합화 등의 필요가 없이 단백질 발현효율이 높다.

얻어진 완전장 cDNA를 아그로박테리움에 의해 식물형질전환을 위한 T-DNA 발현 vector에 cloning한다. 완전장 cDNA 발현을 조절하기 위하여 식물세포 내에서 항시적으로 발현을 유기시키는 promoter 배열과 terminator가 연결된 cassette를 조립한다. 이 완전장 cDNA가 삽입된 T-DNA 집단을 통상의 방법에 의해 아그로박테리움에 도입하고 FOX 아그로박테리움 library를 작제한다. Library 중의 개개의 아그로박테리움에는 각각 별개의 cDNA가 삽입된 vector를 갖고 있다.

그 후 library 중의 cDNA를 아그로박테리움 매개법에 의해 식물에 도입한다. 식물에의 아그로박테리움의 감염은 dipping법을 이용하여 행한다. T-DNA는 통상 1 식물 개체에 1~2 copy밖에 삽입되지 않는다. 따라서 이와 같은 형질전환 식물의 집단은 모두 별개의 1~2 개의 완전장 cDNA를 강발현 할 수 있는 식물 clone의 집단이다. 이와 같은 식물개체의 집단으로부터 목적의 변이체를 선발하는 것이 가능하다.

그런데 완전장 cDNA삽입에 의해 식물이 특정의 표현형을 나타내기 위해서는 몇 개의 기구가 생각되어진다. Sense mRNA를 발현시킨 경우 그 강발현에 의해 정상 단백질이 평상시보다도 다량으로 생산 되던가 또는 본래 생산되지 않은 조직에서 생산되기 때문에 특정의 표현형질이 나타나는 것이 예상된다. 또한 sense mRNA에 의한 silencing 효과에 의해 정상 단백질 양이 감소함에 따라 특정의 표현형질이 나타나는 것도 예상된다. 한편 antisense mRNA의 경우 통상 단백질의 발현량 감소에 의해 특정의 표현형질이 나타나는 것이 생각된다. 여기에서 중요한 것은 어떠한 기구에 의해 특정의 표현형질이 나타난다고 해도 이 system에 있어서는 우성 또는 반우성의 표현형질로서 나타난다고 하는 것이다. 따라서 표현형질의 변화는 도입된 완전장 cDNA에 기인하는 것이라고 생각할 수가 있다.

표현형질의 재확인 및 변이 형질의 원인으로 되는 유전자의 동정방법은 단리된 형질전환 식물체로부터 게놈 DNA를 추출하고, 이 DNA로부터 T-DNA 중에 포함된 promoter 배열과 terminator 배열의 근방 염기배열 정보를 기초로 primer를 설계하여 이것을 이용하여 PCR을 행하여 이들의 전사제어 영역에 끼어있는 cDNA를 단리한다. 이 cDNA를 다시금 상기와 같은 방법으로 promoter 배열과 terminator 배열을 갖는 T-DNA에 삽입하고 이것을 먼저 단리된 형질전환 식물과 동종의 정상 식물에 재도입하여 표현형질의 재확인을 행한다. 그리고 cDNA 염기배열 결정을 행함에 따라 변이형질의 원인으로 되는 유전자를 동정할 수가 있다.

아그로박테리움에 의한 완전장 cDNA의 식물도입에 있어서 완전장 cDNA가 도입된 copy 수는 1~2 copy이기 때문에 cDNA 단리와 표현형질의 확인 공정은 최대한 2회로 충분하고 작업의 성력화 및 효율화를 도모할 수가 있다.

발현조절배열을 포함하는 완전장 cDNA의 library를 식물 집단에 감염시켜 cDNA를 식물에 도입하고, cDNA가 도입된 식물 집단으로부터 목적의 선발조건에 적합한 식물체를 선발하고, 선발된 식물체로부터 cDNA를 단리하고, 단리된 cDNA를 도입된 식물체와 동종의 식물체에 재도입하여 선발조건에 의해 표현형질을 재확인할 수 있는 균질화된 완전장 cDNA 및 FOX-Agrobacterium library 구축하였다.

나. 재료 및 방법

1) Total RNA 추출 및 mRNA 정제

Total RNA는 *B. rapa* 'Osome'의 화아조직, 엽조직 및 경조직으로부터 준비되었다. 각 조직은 동량의 phenol/chloroform(5:1)을 첨가한 유기산 buffer와 2M sodium acetate(pH 4.0) 1ml를 포함한 완충용액으로 추출하였다. 추출 후, RNA를 동량의 isopropanol을 첨가하여 침전하였다. 상청을 1 시간 얼음상에 방치한 후, 15분간 4000rpm 원심을하여 RNA를 침전시켰다. 침전 RNA는 70% ethanol로 세척한 후, 4ml의 멸균수에 현탁하였다. 다당류 및 CTAB제거를 위하여 1.3ml의 5M NaCl을 첨가 후, 1% CTAB, 4M UREA, 50mM TRIS, pH 7.0을 포함한 16ml 반응액을 첨가함으로써 RNA를 침전시켰다. RNA 용액은 실온에서 15분간 4000rpm으로 원심 후, 4ml의 7M guanidine-Cl용액에 현탁하였다. 마지막으로 2배량의 ethanol을 첨가하여 RNA를 침전시켰다. 얼음상에서 1시간 방치한 후, RNA 용액을 15분간 4000rpm으로 원심하였다. 침전물을 70% ethanol로 세척한 후, 멸균수로 현탁하였다. RNA 순도는 OD을 260/280(>1.8) 및 230/260(<0.45)에 의하여 모니터하였다. CTAB에 의하여 정제된 total RNA를 MAXS mRNA isolation kit(Miltenyi Biotec, USA) 및 PolyA-Quick(Stratagene, USA) kit를 사용하여 mRNA를 준비하였다.

2) RNA diol그룹의 biotin화

Biotin 반응을 cDNA 합성 전 및 후에 수행하였다. First-strand 합성 후, 시료에 0.8μl의 0.5M EDTA 및 1.3μl의 5M NaCl을 첨가하였다. 시료를 phenol/chloroform 및 chloroform처리 후, ethanol 침전하였다. 침전물을 70% 및 80% ethanol로 세척한 후, 멸균수에 현탁하였다. 연속하여 시료는 산화촉매제로서 5mM NaIO₄가 포함된 25μl의 66mM sodium acetate용액(pH 4.5)에서 mRNA의 diol 그룹을 산화시켰다. 산화반응은 어두운 상태에서 45분간 얼음상에서 수행하였다. 산화된 mRNA/cDNA hybrid는 연속하여 2.5μl의 5M LiCl, 0.5μl의 10% SDS 및 동량의 isopropanol을 첨가하여 침전시켰다. 또다시 mRNA/cDNA hybrid를

-20°C에서 30분간 방치 후, 4°C, 15분간 15,000rpm 원심하여 침전시켰다. 침전물은 70% ethanol로 세척한 후 25ul의 멸균수로 현탁하였다. 다음으로 2.5ul의 1M sodium acetate(pH 6.1), 2.5ul의 10% SDS 및 75ul의 10mM biocytin hydrazide를 시료에 첨가하였다. RNA의 산화된 diol 그룹은 실온(22-26°C)에서 O/N 방치시킴으로써 biotin화시켰다. 마지막으로 핵산들은 2.5ul의 5M NaCl, 37.5ul의 1M sodium acetate(pH 6.1), 2.5배량의 ethanol을 첨가하여 침전시켰다. 얼음상에서 1시간 방치 후, biotin화된 시료를 4°C, 15분간 원심에 의하여 침전시켰다. 침전물을 70% 및 80% ethanol로 각 1회씩 세척 후, RNase-free 멸균수로 현탁하였다.

3) 자성 bead의 blocking 및 핵산의 capturing

First-strand full-length cDNA/mRNA hybrid를 streptavidin(CPG, New Jersey, USA)으로 coating된 MPG(magnetic porous glass)입자에 capturing시켰다. 핵산 결합전에 100ul의 bead(1% 현탁액: 1mg의 bead는 800pmol의 biotin화된 25-mer oligonucleotide를 결합시킬수 있음)를 10ul의 40ug/ul DNA-free tRNA를 첨가하여 blocking시켰으며, 얼음상에서 온화하게 혼합하면서 1시간 방울시켰다. 핵산 capturing 직전에 magnetic stand를 이용하여 bead를 분리하였으며, pipetting하여 상청을 제거하였다. Blocking 절차 후에 bead를 500ul의 2M NaCl 및 50mM EDTA, pH 8.0 용액으로 3회 세척하였으며, 100ul의 2M NaCl 및 50mM EDTA, pH 8.0 용액에 현탁하였다. cDNA(약 0.5ug)를 bead sedimentation을 방지하기 위하여 carrier로서 100ug의 tRNA 존재하에 온화하게 혼합하면서 30분간 실온에서 capturing하였다. 비결합된 cDNA를 제거 후, bead를 100ug/ml tDNA를 포함한 500ul의 2M NaCl 및 50mM EDTA, pH 8.0 용액으로 4회 세척하였다. 최후로, cDNA를 100mM NaOH, 5mM EDTA를 처리한 bead로부터 elution 시킨 후, alkaline gel에 loading하였다(Fig. 2-1).

4) First-strand cDNA 준비

1-2 μ g의 mRNA를 1 μ g의 first-strand *Xho*I primer-adapter와 함께 65°C, 10분간 변성시켰다. 역전사반응은 50mM Tris-HCl, pH 8.3, 75mM KCl, 4.5mM MgCl₂, 10mM DTT와 각 3mM의 dATP, dTTP, dGTP 및 dCTP를 포함한 total 20 μ l의 용액에서 실시하였다. 또한, 방사선표식을 위하여 반응용액에 1 μ l의 [α -³²P]dGTP(3000 Ci/mMol, 10mCi/ μ l, Amersham, UK)를 첨가하였다. Thermal cycler(GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, USA)를 이용하여 primer의 회합을 하였으며, 반응액은 45°C에서 전처리한 후, 반응혼합액에 pFLC-III를 첨가하였다. 그 후, 회합반응은 35°C가 될 때까지 1분에 1°C씩 하강시켰다. 그리고 다시 35°C에서 5분간 연속처리 후, 1시간에 걸쳐 45°C까지 상승시킨 후, 10분간 50°C 처리하였다. First-strand 합성량을 계산하기 위하여 0.5 μ l의 방사선 표식 반응용액을 DE-81 paper상에 spot한 후, 방사능을 측정하여 incorporation(cpm)을 계산하였다.

5) Full-length cDNA의 RNase protection 및 TAP처리

0.5ug의 first-strand cDNA의 RNase protection을 위해 RNase I(RNase ONE™, Promega, USA) 20unit를 사용하여 30°C, 30분간 처리하였다. Cap제거를 위하여 150unit의 TAP(Nippon Gene, Japan)를 사용하였다.

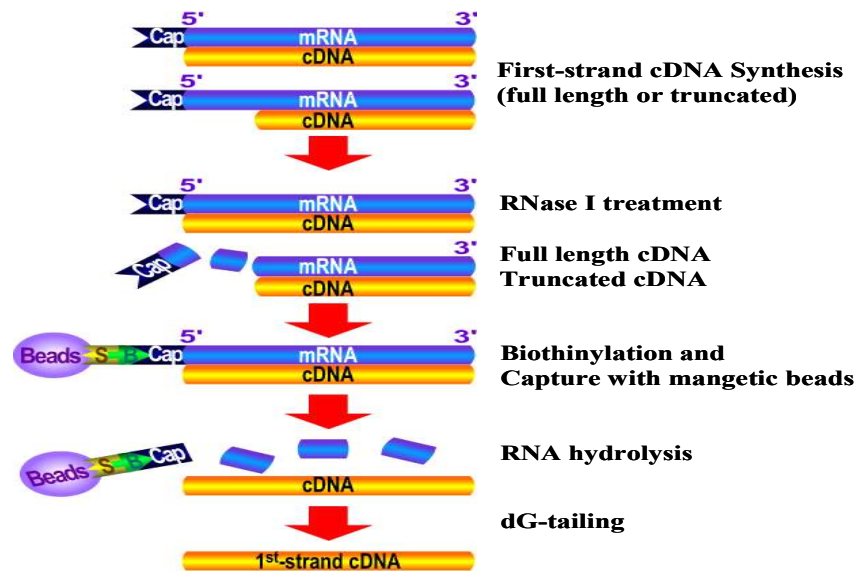


Figure 2-1. Flowchart of the proposed protocol for the preparation of the cDNA library by using the modified biotinylated cap trapper.

6) Full-length cDNA의 capturing

Full-length cDNA는 미리 block시킨 500ul의 자성 bead를 이용하여 capturing하였다. 비결합된 cDNA를 제거한 후에 bead를 100ug/ml tRNA가 포함된 0.5M EDTA, pH 8.0 용액으로 4회 세척하였다. 그 후, 0.4% SDS, 50ug/ml tRNA용액으로 1회, 20% glycerol, 10 mM NaCl, 0.2mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH 7.5 용액으로 1회, 50ug/ml tRNA가 포함된 nuclease-free 멸균수로 2회, nuclease-free 멸균수로 1회, 1x RNase H buffer(20mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM MgCl₂, 20mM KCl, 0.1mM EDTA, 0.1mM DTT)로 1회 세척하였다. Bead로부터 full-length cDNA를 분리하기 위하여 시료를 0.1% SDS 및 10mM EDTA가 첨가된 100ul의 RNase H buffer(2 units)로 37°C에서 30분간, 65°C에서 10분간 연속 반응시켰다. 불완전한 RNase H 처리로 인하여 bead로부터 제거되지 않은 cDNA fraction(약 60%의 cDNA가 결합됨)을 제거하기 위하여 100 ul의 Tris-formate buffer, pH 9.0 용액에서 65°C, 10분간 alkaline 가수분해를 수행하였다. 반응 후, bead로부터 cDNA가 들어있는 수층을 분리하기 전에 5ul의 10% SDS 및 1ul의 0.5M EDTA를 첨가하였다. Alkaline elution을 3회 반복하였으며, 동시에 alkaline처리 fraction 및 RNase H-fraction도 함께 제거시켰다. Single-strand cDNA를 phenol/chloroform으로 1회 추출하였으며, G50 Sephadex chromatography에 주입하였다. 방사선 표식 fraction을 튜브에 수집하였고 2ug의 glycogen을 첨가 후, cDNA를 ethanol 침전시켰다.

7) Single-strand cDNA의 oligo(dG) tailing

Single-strand cDNA의 oligo(dG) tailing반응을 200mM sodium cacodylate, pH 6.9, 1mM MgCl₂, 1mM CoCl₂, 1mM 2-mercaptoethanol, 100mM dGTP 및 32 unit의 terminal deoxynucleotidyl transferase(Takara)가 포함된 용액에서 수행하였다. 시료를 37°C, 30분간 반응시킨 후, EDTA를 최종 농도 50mM이 되도록 첨가하였으며 phenol/chloroform 및 chloroform추출을 1회 수행한 후, ethanol 침전시켰다.

8) Second-strand cDNA 합성

Oligo(dG)가 tailing된 first-strand cDNA를 최종량 60ul로 반응액을 조성하였다[3ul의 second-strand low buffer, 3ul의 second-strand high buffer, 600ng의 second-strand *SacI* primer-adapter, 0.25mM dNTP, 0.5mM beta-NADH, 15unit의 Ex *Taq* DNA polymerase(Takara), 150 unit의 Ampligase, DNA ligase, 3 unit의 Hybridase, RNase H 포함]. PCR반응은 "hot start"법을 이용하였으며, 55°C에서 5분간 반응시킨 후, 35°C까지 분당 0.3°C 씩 하강시키면서 primer 회합을 수행하였다. 그 후 반응액은 35°C에서 15분간 처리후 72°C에서 15분간 연속 반응시켰다. 회합/신장 cycle을 3회 반복하였다. 마지막으로 1ul의 0.5M EDTA, 1ul의 10% SDS 및 2ul의 proteinase K(10ug/ul)를 첨가한 후, 시료를 45°C에서 15분간 반응시켰다. 시료를 phenol/chloroform 및 chloroform 추출한 후, ethanol 침전시켰다.

9) 제한효소 절단 및 cloning

cDNA를 *SaI/XhoI* 및 *BamHI*으로 절단하였다. 시료에 1ul의 0.5M EDTA, 1ul의 10% SDS 및 2ul의 proteinase K(10ug/ul)를 첨가한 후, 45°C에서 15분간 반응시켰다. 시료를 phenol/chloroform 처리하였으며 Sephadex(G100) chromatography로 분획한 후, ethanol 침전시켰다. 140ng의 cDNA를 lambda pFLC-III vector에 12°C, O/N ligation 반응시켰다. 시료를 전기영동 한 agarose gel로부터 lambda arm을 정제하기 위하여 agarase를 이용하였다. Ligation 된 cDNA는 phenol/chloroform 및 chloroform추출 후, phage에 pakaging하였다.

10) Plasmid DNA추출 및 염기서열 결정

Plasmid DNA를 RNase A 처리 후, 추출하였다. DNA 염기서열은 Dye Terminator kit를 이용하여 Applied Biosystem DNA sequences 377로 결정하였다. DNA hybridization은 7% PEG 6000, 10% SDS, 100ug/ml salmon sperm DNA가 포함된 hybri 용액에서 65°C, O/N 반응하였다. Hybridization 반응 후, 필터를 2x SSC 및 0.1% SDS용액을 이용하여 65°C에서 세척하였다. 염기서열의 상동성은 BLAST를 이용하여 분석하였다.

11) *in vitro* Excision

Phage DNA 추출은 Promega사제의 "Wizard[®] Lambda Preps DNA Purification System"(cat. #A7290)을 사용하였다. 1회 증폭한 phage stock을 적어도 1×10^{10} pfu 사용하여 실험하였다. *in vitro*에서 Cre recombinase에 의한 excision을 하기 위해서 phage DNA를 다시 정제하였다. 본 실험에서는 "MicroSpin S-400 HR column"(Amersham Bioscience, cat. #27-5140-01)을 이용한 phage DNA의 gel 여과를 하였다. 정제 phage DNA의 agarose gel 전기영동해석을 하여 phage DNA의 정량 및 품질확인을 하였다. EtBr을 포함한 1% agarose gel에 2μL 및 5μL의 시료를 정량 marker(λDNA 각 5ng, 10ng, 30ng, 40ng, 50ng)와 함께 영동하였다. 단시간 전기영동한 후, 시료를 marker와 비교하여 결정하였다. Phage DNA를 plasmid로 변환하기 위하여 phage DNA의 Cre recombinase를 반응시켜 절출하였다. 본 실험에서는 New England BioLabs의 Cre recombinase(cat. #M0298 S)를 사용하였다. Kit 내에는 pLox2+ control DNA가 포함되어 있으며 control로서 매회 사용하였다. 직선화한 pLox 2+의 길이는 3.65 kb로 양쪽으로부터 약 350bp의 위치에 *loxP* 부위가 있다. 2

개의 *loxP* 부위간에 복제 origin이나 ampicillin 내성유전자가 위치하고 있고, 이들 2개의 *loxP* 부위간에서 조환이 일어나면 환상의 ampicillin 내성 plasmid가 만들어진다(Fig. 2-2). Excision에서 절출한 plasmid DNA를 대장균에 도입시켰다. 본 실험에서는 형질전환율이 높은 electroporation법을 사용하였다. 박테리아는 ElectroMAX™DH10B™ T1 Phage Resistant Cells(Invitrogen, cat. #12033-015), 전기융합장치는 Disposable Microelectroporation Chamber(Whatman, cat. #11608-031), CELL-PORATOR® Pulse Control and Power Supply(Invitrogen LIFE TECHNOLOGIES™)을 사용하였다.

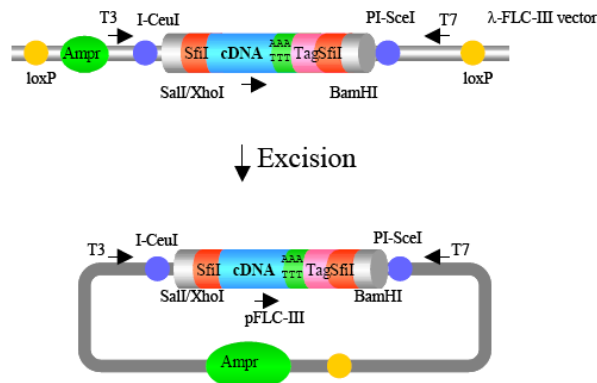


Figure 2-2. pFLC-III vector map. This vector derived from pBlueScript. Library when producing, cloning regions are *Sal* I/ *Xho* I and *Bam* H I. *LoxP* sequence are inserted between *Amp*^r and Ori.

12) cDNA의 5'말단 및 3'말단의 sequence 해석

BigDye^R Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystem사)를 이용하여 cDNA의 5'말단 및 3'말단의 sequence 반응을 하였다. 반응액을 DNA analyzer ABI3700(Applied Biosystem사)로 전기영동하여 해석하였다. 5'말단배열 해석용 primer(M13-21 seq. primer)로서는 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3', 3'말단배열 해석용 primer로서는 RV-M primer; 5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA-3' 및 T7 promoter primer; 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'를 사용하였다.

13) Fox-hunting system을 이용한 Agrobacterium library 작제

cDNA insert를 혼합물체로 강발현 대장균 plasmid vector로 옮겨 필요량의 대장균을 수집, plasmid 추출 후, Agrobacterium에 도입하여 Agrobacterium library를 작제하였다. 완전장 cDNA의 번역개시 ATG codon이 promoter뒤에 반드시 결합되도록 완전장 cDNA를 강발현 vector와 함께 디자인하였다. 그래서 우선 강발현형 binary vector에의 삽입 공정을 위하여 완전장 cDNA를 특정 제한효소로 절단하여 insert cDNA를 회수하였으며 동일한 제한효소로 절단해 둔 강발현 vector에 도입하였다. 이와 같이 구축된 vector를 대장균에 cloning하였다. 작제한 Agrobacterium library로부터 bacteria를 단리, 회수한 plasmid를 대장균에 형질 전환하여 colony-PCR법으로 확인하였다. 품질확인으로서 임의의 14 colony로부터 plasmid를 회수, PCR을 행하여 몇 %의 확률로 유전자가 도입되었으며, 또는 그 사이즈 및 종류의 중복도를 조사하였다.

다. 결과 및 고찰

1) *B. rapa* ('Osome')의 mRNA 정제 및 품질 검사

B. rapa ('Osome')의 엽조직으로부터 tRNA를 추출한 후 tRNA로부터 mRNA를 정제하였다. 양질의 mRNA를 정제하기 위하여 일본의 Dnaform Co.에서 사용하는 mRNA 정제법과 순천대에서 사용하는 정제법을 비교하였다. 그 결과 순천대에서 사용하는 정제법이 회수량은 많았으나, 순도면에서는 Dnaform Co.의 방법이 우수하였다(Table 2-1, Fig. 2-3). Dnaform Co.의 방법으로 tRNA 1mg으로부터 mRNA 4ug을 얻었다. 회수율은 0.4%로 다른 식물과 거의 같은 수준이었다. 1% agarose gel에 tRNA 및 정제한 mRNA를 분획한 결과 Dnaform Co.의 방법으로 정제한 mRNA의 분획양상(size, contents)이 우수함을 알 수 있었다.

Table 2-1. mRNA concentration and Rate of extraction From leaf of *B. rapa*.

| Tissue | 260/280 | 260/230 | Conc. (ug/ul) | Vol.(ul) | Total RNA(ug) | mRNA (ug) | Rate of Extraction (%) |
|------------------------------|---------|---------|---------------|----------|---------------|-----------|------------------------|
| Total RNA of leaf | 1.732 | 2.743 | 12.14 | 200 | 2,427 | - | - |
| mRNA of leaf (Dnaform) | 1.714 | 2.049 | 0.34 | 12 | - | 4.0 | 0.4 |
| mRNA of leaf (Sunchon Univ.) | 1.764 | 2.101 | 1.50 | 15 | - | 22 | - |

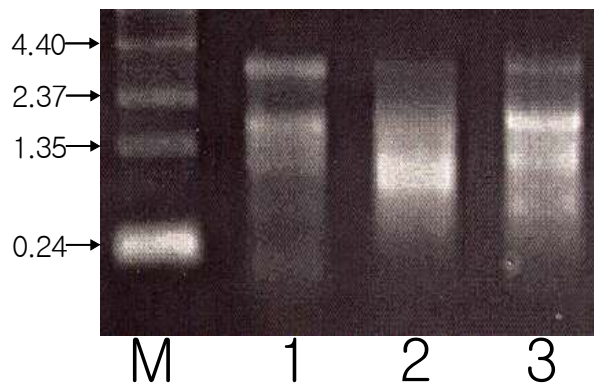


Figure 2-3. Extraction of mRNA running on gel electrophoresis.

M: DNA standard marker, 1: tRNA, 2: Dnaform prep. mRNA, 3: Sunchon Univ. prep. mRNA.

엽조직으로부터 정제한 mRNA의 QC를 분석하였다. Table 2-2에 나타냈듯이 Dnaform Co. 방법의 시료가 ribosomal RNA의 혼입이 적었고(RNA QC), 역전사 반응에서의 합성량도 양호하였다(1st QC). 또한, Fig. 2-4에 나타냈듯이 전기영동 해석으로부터 합성된 cDNA의 length도 Dnaform Co.에서 조제한 것이 길었다(1st QC).

B. rapa ('Osome')의 화아, 엽 및 경조직으로부터 총 16회 mRNA 정제를 수행하였다. mRNA의 품질검사를 위하여 흡광도 측정, 변성gel에 의한 전기영동 해석 및 single strand cDNA의 alkali gel 해석을 실시하였다. 정제 mRNA를 이용하여 흡광도를 측정하였던 바, 엽

육조직의 흡광도비에 약간 문제가 있었지만 single strand cDNA 합성에 영향을 미치지 않는 범위라고 생각되었다. mRNA의 정제 수량은 화아조직 23ug, 엽조직 21ug 및 경조직 20ug 이었다(Table 2-3). 정제 mRNA의 일부를 이용하여 akali 변성 gel에 전기영동을 하였다. 그 결과 RNA의 분해는 발견되지 않았으며, RNA의 size적 분포도 양호하였다(Fig. 2-5).

Table 2-2. QC analysis by mRNA of *B. rapa* ('Osome').

| | Sunchon Univ. prep mRNA | | Dnaform prep mRNA | | control | |
|------------------------|-------------------------|--------|-------------------|--------|---------|--------|
| | ×1 | | ×1 | | ×1 | |
| Before wash(cpm), 1 ul | 125741 | 126081 | 145773 | 143373 | 126245 | 122175 |
| After wash (cpm) | 1011 | 1003 | 1736 | 1703 | 697 | 664 |
| Incorporation rate(%) | 0.80 | 0.80 | 1.19 | 1.19 | 0.55 | 0.54 |
| Synthesized cDNA(ug) | 0.09 | 0.09 | 0.13 | 0.13 | 0.06 | 0.06 |
| Total cpm | 31038 | 30792 | 53295 | 52282 | 21398 | 20385 |
| cpm/ug | 354151 | 355109 | 410572 | 403812 | 355571 | 344108 |
| Net mRNA(%) | 29.2 | 28.9 | 43.3 | 43.2 | 20.1 | 19.7 |

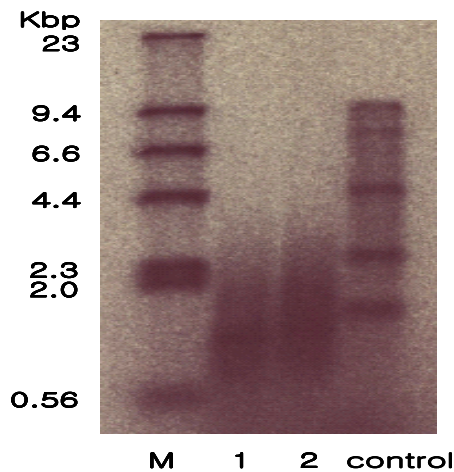


Figure 2-4. Extraction of mRNA running on gel electrophoresis. M: Lamda/*Hind*III, 1: Sunchon Univ. prep. mRNA, 2: Dnaform prep. mRNA, control: RNA ladder 0.24-9.5 Kbp.

또한 정제 mRNA의 일부를 이용하여 single strand cDNA를 합성하였다. cDNA 합성시에 RI를 이용하기 때문에 RI 표식율로 cDNA합성량의 견적을 계산하였다. cDNA 합성량은 통상보다 다소 적었다. 또한 합성된 cDNA의 일부를 이용하여 akali gel 전기영동 해석을 하였다. cDNA의 length가 약간 짧아보였으나 큰 문제점은 아니라고 생각되었다(Fig. 2-6).

이상의 3가지 품질검사 결과, 정제된 mRNA는 완전장 cDNA작제 시료로서 적합하다고 판단되었다.

Table 2-3. mRNA extracted from total RNA of flower, leaf and stem.

| Tissue | Recovery of mRNA | A _{268/280} | A _{260/230} | mRNA volume (ug) |
|--------|------------------|----------------------|----------------------|------------------|
| Flower | 5 | 1.73 | 0.46 | 23 |
| Leaf | 8 | 1.65 | 0.55 | 21 |
| Stem | 3 | 1.75 | 0.33 | 20 |

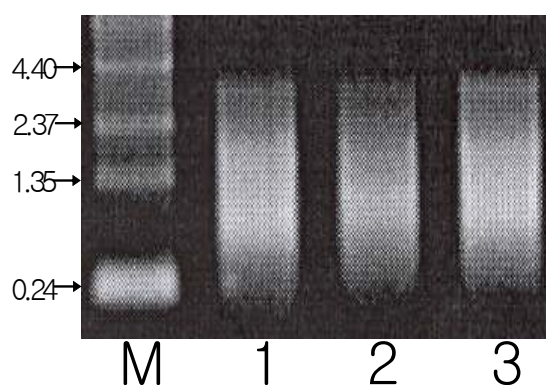


Figure 2-5. Extraction of mRNA running on gel electrophoresis. M: DNA standard marker, 1: Flower of mRNA, 2: Leaf of mRNA, 3: Stem of mRNA.

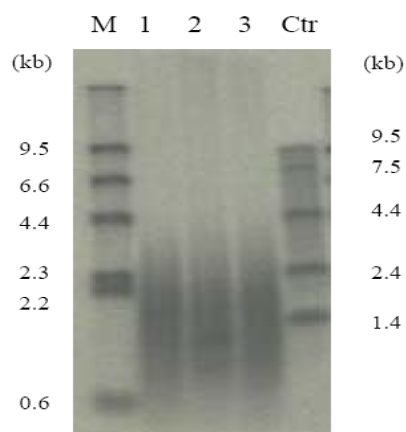


Figure 2-6. cDNA synthesis running on gel electrophoresis. M: Lamda/*Hind*III, 1: cDNA of flower, 2: cDNA of leaf, 3: cDNA of stem, Ctr: single strand cDNA reaction control.

2) *B. rapa* ('Osome')의 cDNA library 작제

가) *B. rapa* ('Osome')의 완전장 cDNA library 작제

'Osome'의 화아, 엽 및 경조직 3종을 종합한 full library를 작제하였다. 각각의 total RNA로부터 완전장 cDNA 합성기술을 응용하여 균일화되고 완전장율이 높은 cDNA library를 작제하였다(Library ID: IP002N01).

① Single strand cDNA 합성

품질검사를 통과한 mRNA로부터 완전장 cDNA기술을 응용하여 single strand cDNA 합성을 수행하였다. *Sfi* I 배열 및 tag배열을 갖는 oligo dT primer를 사용하였고, 3종(화아, 엽, 경)시료에 각각의 tag배열을 갖는 primer를 사용하였다(Table 2-4). dNTP중 dCTP 대신에 5-methyl dCTP를 이용하여 single strand cDNA를 methyl화 하였다. 또한 library 작제의 전 공정에 있어서 cDNA의 량 및 품질을 모니터하기 위하여 single strand cDNA 합성시에 cDNA를 RI로 표식하였다. 합성된 cDNA 일부를 이용하여 알칼리 gel 전기영동을 행하여 single strand cDNA가 문제없이 합성된 것을 확인하였다.

Table 2-4. Single strand and double strand cDNA synthesis using of primers.

| Primer | 배열 (5'-3') |
|----------------------------|---|
| Single strand cDNA(Flower) | GAGAGAGAGAGGATCCTTTGGCCCTTATGGCCTACGTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN <i>Ban</i> HI <i>Sfi</i> I tag |
| Single strand cDNA(Leaf) | GAGAGAGAGAGGATCCTTTGGCCCTTATGGCCCATGTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN <i>Ban</i> HI <i>Sfi</i> I tag |
| Single strand cDNA(Stem) | GAGAGAGAGAGGATCCTTTGGCCCTTATGGCCCTGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN <i>Ban</i> HI <i>Sfi</i> I tag |
| Double strand cDNA | AGAGAGAGAGCTCGAGGGCCAAATCGGCCATCAC <i>Xho</i> I <i>Sfi</i> I |

② Cap/Trapping법에 의한 완전장 cDNA 선택

Single strand cDNA/RNA hybrid의 diol기의 산화, biotin화, RNAaseI처리를 행한 후, Cap/Trapping법에 의해 완전장 cDNA/RNA hybrid를 선택적으로 bead에 결합시켰다. 연속하여 알칼리 처리에 의해 RNA를 분해하여 single strand 완전장 cDNA를 회수하였다. 또한 Cap/Trapping공정에 의해 불완전장 cDNA가 제거되었다.

③ 5' 특이적 cloning부위의 삽입

Cap/Trapping후의 single strand cDNA에 adaptor를 결합하였고 5' 특이적 cloning 부위를 삽입 후, gel 여과에 의해 미반응의 adaptor를 제거하였다. Adaptor에는 *Sfi* I배열을 디자인하였다(Table 2-5). Adaptor 중의 *Sfi* I 부위와 single strand cDNA합성 primer중의 *Sfi* I 부위는 상이한 배열로 되어있다.

Table 2-5. Adaptor primer sequence.

| | Sequence (5'-3') |
|----------------|---|
| Adaptor GN5 | AGAGAGAGAGCTCGAGGGCCAAATCGGCCATCACGNNNNN TCTCTCTCTCGAGCTCCCGGTTTAGCCGGTAGTG <i>Xho</i> I <i>Sfi</i> I |
| Adaptor N6 | AGAGAGAGAGCTCGAGGGCCAAATCGGCCATCACGNNNNN TCTCTCTCTCGAGCTCCCGGTTTAGCCGGTAGTG <i>Xho</i> I <i>Sfi</i> I |

④ cDNA의 균일화

Adaptor를 결합한 cDNA를 tester, 대상물의 mRNA(cDNA작제에 이용한 mRNA)를 biotin화한 것을 driver로 사용하여 다음 조건으로 hybridization하였다.

mRNA : cDNA = 1 : 1

RoT: 10(Ro: RNA의 초기농도, T: 시간)

Hybridization종료 후, RNAase I 처리 및 스트랩토 아비진으로 coat된 자성을 갖는 비즈와의 결합을 행하였으며, 비결합 용액(균일화된 cDNA 용액)을 회수하였다.

⑤ Double strand cDNA합성

균일화 한 single strand cDNA를 주형으로 double strand cDNA를 합성하였다. 합성 확인을 위하여 합성 시에 시료의 일부를 RI 표식하였고, 전기영동에 의해 문제없이 double strand cDNA가 합성된 것을 확인하였다(Fig. 2-7). Double strand cDNA합성 primer배열을 Table 4에 나타내었다.

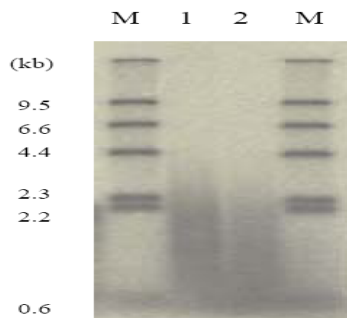


Figure 2-7. Double strand cDNA running on gel electrophoresis. M: Lambda/*Hind*III, 1: cDNA mixture of flower, leaf and stem, 2: double strand cDNA.

⑥ 제한효소 절단 및 cloning

Double strand cDNA를 *Bam*HI, *Xho*I으로 절단 후, alkaline phosphatase 처리에 의해 cDNA말단의 탈인산화 및 gel 여과에 의해 짧은 DNA단편을 제거하였다. 정제한 cDNA를 λ-FLC-III-F vector(Fig. 2-8)에 삽입하였고, 연속하여 pakaging을 하였다(original phage library). Original phage library의 titer는 1.9×10^6 pfu 이었다.

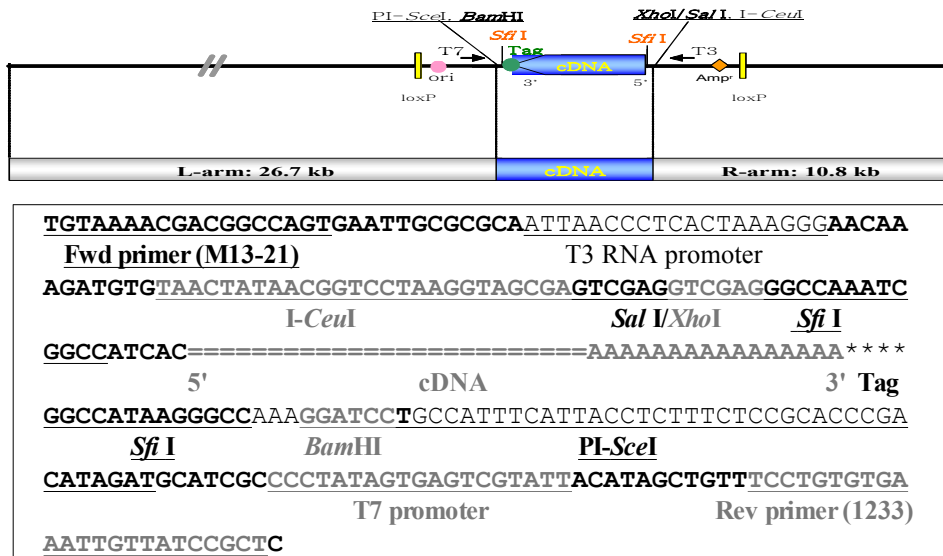


Figure 8. Map and sequence of λ-pFLCIII-F cDNA(*Sfi*I, 4bp Tag) vector.

⑦ Original phage library의 고체 배지상의 증폭

Original phage 용액은 상당히 불안정하기 때문에 고체배지 plate상에서 1회만 증폭하였다. 고체배지 plate상에 증폭한 phage를 SM buffer(50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 8mM MgSO₄, 0.01%(w/v)Gelatin, pH 7.5)로 용출하였다(1회 증폭 phage library). Titer측정 결과, 2.5 x 10⁷ pfu/uL 이었고 문제없이 phage의 증폭이 완료된 것을 확인하였다. DMSO를 최종농도 7%로 되게끔 첨가하여 2mL용 tube에 1mL씩 분주한 것을 10분, 나머지를 50mL에 분주하여 -80°C에 보관하였다(Table 2-6).

Table 2-6. Titer and division of phage.

| Titer | Division |
|------------------------------|--------------------------|
| 2.5 x 10 ⁷ pfu/uL | 1 mL x 10 (2 mL tube) |
| | 43.7 mL x 2 (50 mL tube) |

⑧ Plasmid library로 변환

1회 증폭 phage library 용액의 일부를 이용하여 *in vitro* excision에 의해 plasmid화 하였다. 이 일부를 이용하여 *E. coli* DH10B T1 phage 내성주의 형질전환을 수행하였고, 13% glycerol이 포함된 SOC배지(2% Bacto tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.05% NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose, pH 7.0)에 저장하여 -80°C에 보관하였다(Table 2-7). Excision한 DNA잔액은 멸균수로 용해한 상태로 -20°C에 보관하였다(Table 2-8).

Table 2-7. Glycerol stock of plasmid library

| Titer | Division |
|--------------------------------|-------------------------|
| 6.9 x 10 ⁴ cfu/tube | 0.25 mL x 2 (2 mL tube) |

Table 2-8. Concentration and division of excised DNA

| Concentration of excised DNA | Division |
|------------------------------|-------------------------|
| 25 ng/uL | 10 uL x 1 (0.5 mL tube) |

3) 완전장 cDNA의 품질 확인

가) 품질 확인용 plasmid DNA의 조제

Plasmid glycerol stock의 일부를 plate에 도말, 배양하였다. 생육한 colony로부터 96개의 clone을 random으로 선택하여 100ug/mL ampicilin을 포함한 TB액체배지(1.2% Tryptone, 2.4% Yeast Extract, 0.4%(v/v) Glycerol, 17 mM KH₂PO₄, 72 mM K₂HPO₄)를 넣은 96공 plate에 식균, 37°C에서 하룻밤 진탕 배양 후, plasmid DNA를 조제하였다.

나) cDNA의 length 확인

상기 조제 plasmid DNA용액의 일부를 *Pvu* II로 절단 후, EtBr을 포함한 1% agarose gel 전기영동해석을 하였다. *Pvu* II절단이 불완전한 sample 및 해상도가 나쁜 sample을 배제한 후, 해석 가능한 DNA단편에 대하여 gel image analyzer(UVP사제)로 해석하였고, cDNA length를 산출하였다(Fig. 2-9). 평균 length는 1.3 kbp 이었다. 유효해석수 90 clone은 500 bp 이하 5 clone, 500-1000 bp 26 clone, 1000-1500 bp 27 clone, 1500-2000 bp 22 clone, 2000-2500 6 clone, 3000-3500 bp 4 clone으로 분포하였다.

다) cDNA 5'말단의 sequence 해석

상기의 조제 plasmid DNA, 96 clone을 sequence 반응용으로 농도조정 한 후, BigDye^R Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystem사)를 이용하여 5' 말단의 sequence반응을 하였다. 반응액을 DNA analyzer ABI3700 (Applied Biosystem사)로 전기영동하여 해석하였다. Sequence 성공수는 96 clone중 92 clone이었으며(Table 2-9), 성공수 92 clone중 중복은 2 clone, 오염 clone은 없었다(Table 2-10). 완전장을 해석에 있어서 *Brassicaceae* 유래의 mRNA에 95%이상의 상동성으로 hit한 clone 수는 6, 적어도 ORF의 5'측이 포함되어 있는 clone 수는 3이었다(Table 2-11). cDNA 5'측 해석 결과, e-10이하의 significance로 hit한 clone 수는 88이었다(Table 2-12).

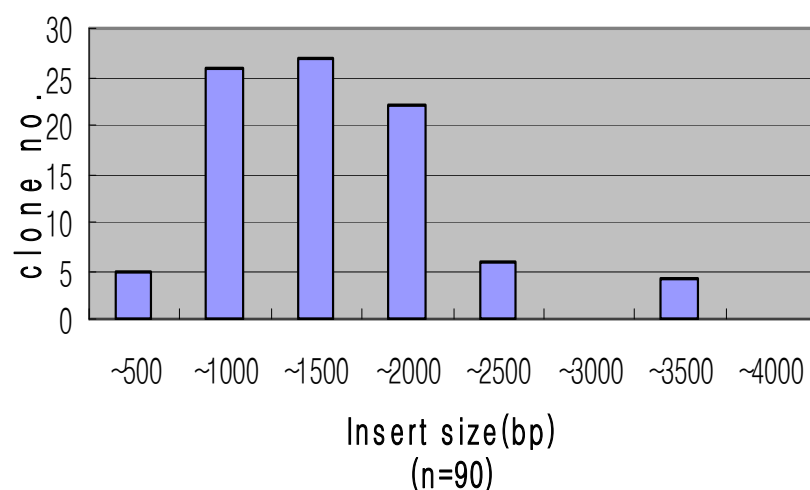


Figure 2-9. Range length of cDNA.

Table 2-9. Number of hit with Sequence

| Library | Source | Sequence clone number | Number of hit |
|----------|----------------------------------|-----------------------|---------------|
| IP002N01 | glycerol stock colony of plasmid | 96 | 92 |

Table 2-10. Repetition and pollution by analysis of clone

| Library | Hit | Repetition clone | Pollution clone |
|----------|-----|------------------|-----------------|
| IP002N01 | 92 | 2 | 0 |

Table 2-11. Full length cDNA of analysis

| Library ID | Hit | Full | Truncate |
|------------|-----|------|----------|
| IP002N01 | 6 | 3 | 1(1) |

Table 2-12. 5'-end cDNA of analysis : Forward read (orf.xls)

| Library | ORF (aa >100) | RefSeq plant hit | Met Not Found |
|----------|---------------|------------------|---------------|
| IP002N01 | 76 | 88(84) | 7 |

Table 2-12. Blastn result analysis of 5'-Sequence 92 clone

| acc. no | clone name | 5'-Sequence | | | | | |
|---------|------------|--------------|-------------------|-----|-------------|----------------|--|
| | | length (dna) | longest orf (>30) | | | refseq(plant) | |
| | | | start | end | length (aa) | same/other | comment |
| 1 | A02 | 714 | 153 | 717 | 187 | same ORF hit | Met was found in ORF |
| 2 | A03 | 777 | 20 | 658 | 212 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met but contains frame shift</u> |
| 3 | A04 | 509 | 178 | 317 | 46 | same ORF hit | Met was found in ORF |
| 4 | A05 | 685 | 122 | 688 | 188 | same ORF hit | Met was found in ORF |
| 5 | A06 | 731 | 16 | 689 | 224 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met but contains frame shift</u> |
| 6 | A07 | 706 | - | - | - | - | - |
| 7 | A08 | 718 | 86 | 721 | 211 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 8 | A09 | 725 | 91 | 725 | 211 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met but contains frame shift</u> |
| 9 | A10 | 707 | 19 | 683 | 221 | same ORF hit | Met was found in ORF |
| 10 | A11 | 463 | 115 | 305 | 63 | same ORF hit | Met was found in ORF |
| 11 | A12 | 730 | 100 | 730 | 210 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 12 | B01 | 765 | 205 | 767 | 187 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 13 | B02 | 687 | 345 | 573 | 75 | other part hit | <u>match start from 1st Met but contains frame shift</u> |
| 14 | B03 | 759 | 42 | 681 | 212 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met but contains frame shift</u> |
| 15 | B04 | 729 | 30 | 732 | 233 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 16 | B05 | 710 | 514 | 689 | 58 | other part hit | Truncated? |
| 17 | B06 | 629 | 86 | 629 | 181 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met but contains frame shift</u> |
| 18 | B07 | 723 | 97 | 680 | 194 | same ORF hit | Met was found in ORF |
| 19 | B08 | 749 | 78 | 603 | 174 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met but contains frame shift</u> |
| 20 | B09 | 640 | 51 | 384 | 110 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 21 | B10 | 749 | 115 | 740 | 208 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 22 | B11 | 749 | 439 | 569 | 43 | other part hit | Truncated? |
| 23 | B12 | 712 | 50 | 715 | 221 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 24 | C01 | 676 | 403 | 676 | 91 | other part hit | Met was found in ORF |
| 25 | C02 | 106 | - | - | - | - | - |
| 26 | C05 | 597 | 386 | 568 | 60 | other part hit | Met was found in ORF |
| 27 | C06 | 730 | 251 | 601 | 116 | other part hit | <u>match start from 1st Met but contains frame shift</u> |
| 28 | C07 | 665 | 87 | 669 | 193 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met but contains frame shift</u> |
| 29 | C08 | 736 | 98 | 739 | 213 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met but contains frame shift</u> |
| 30 | C09 | 713 | 84 | 618 | 177 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met but contains frame shift</u> |
| 31 | C10 | 720 | 98 | 691 | 197 | same ORF hit | Met was found in ORF |
| 32 | C11 | 569 | 79 | 407 | 109 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 33 | C12 | 626 | 522 | 618 | 31 | - | - |
| 34 | D01 | 740 | 169 | 644 | 158 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met but contains frame shift</u> |
| 35 | D02 | 670 | 81 | 672 | 196 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met but contains frame</u> |

| | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----------|----------------|--|
| | | | | | | | shift |
| 36 | D03 | 774 | 25 | 683 | 219 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met but contains frame shift</u> |
| 37 | D04 | 738 | 76 | 740 | 221 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 38 | D05 | 699 | 76 | 701 | 208 | same ORF hit | Met was found in ORF |
| 39 | D06 | 510 | 4 | 287 | 94 | same ORF hit | Met was found in ORF |
| 40 | D07 | 676 | 79 | 676 | 199 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 41 | D08 | 753 | 119 | 616 | 165 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met but contains frame shift</u> |
| 42 | D09 | 656 | 46 | 656 | 203 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 43 | D10 | 576 | 40 | 440 | 133 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 44 | D11 | 795 | 100 | 680 | 193 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met but contains frame shift</u> |
| 45 | D12 | 687 | 81 | 576 | 164 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 46 | E01 | 687 | 28 | 686 | 219 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met but contains frame shift</u> |
| 47 | E02 | 730 | 78 | 732 | 217 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 48 | E03 | 736 | 559 | 662 | 34 | other part hit | Truncated? |
| 49 | E04 | 526 | 62 | 529 | 155 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met but contains frame shift</u> |
| 50 | E05 | 708 | 504 | 681 | 58 | other part hit | Truncated? |
| 51 | E06 | 680 | 6 | 495 | 162 | same ORF hit | Met was found in ORF |
| 52 | E07 | 786 | 36 | 543 | 168 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 53 | E08 | 634 | 119 | 637 | 172 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 54 | E09 | 665 | 94 | 443 | 116 | – | – |
| 55 | E10 | 665 | 46 | 467 | 140 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 56 | E11 | 781 | 119 | 784 | 221 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met but contains frame shift</u> |
| 57 | E12 | 641 | 34 | 641 | 202 | same ORF hit | Truncated? |
| 58 | F01 | 755 | 67 | 713 | 215 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 59 | F03 | 644 | 60 | 648 | 195 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 60 | F04 | 720 | 72 | 492 | 139 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 61 | F05 | 697 | 76 | 697 | 207 | same ORF hit | Met was found in ORF |
| 62 | F06 | 723 | 164 | 712 | 182 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met but contains frame shift</u> |
| 63 | F07 | 742 | 365 | 679 | 104 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 64 | F08 | 639 | 67 | 614 | 182 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 65 | F09 | 680 | 199 | 629 | 143 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met but contains frame shift</u> |
| 66 | F10 | 731 | 62 | 718 | 218 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 67 | F11 | 636 | 55 | 563 | 169 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 68 | F12 | 659 | 112 | 659 | 182 | same ORF hit | Met was found in ORF |
| 69 | G01 | 609 | 95 | 610 | 171 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 70 | G02 | 683 | 53 | 683 | 210 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 71 | G03 | 480 | 72 | 300 | 75 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 72 | G04 | 748 | 112 | 656 | 181 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met but contains frame shift</u> |
| 73 | G05 | 695 | 524 | 628 | 34 | other part hit | Truncated? |
| 74 | G06 | 612 | 135 | 534 | 132 | same ORF hit | Met was found in ORF |
| 75 | G07 | 693 | 226 | 695 | 156 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met but contains frame shift</u> |
| 76 | G08 | 693 | 36 | 573 | 178 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met but contains frame shift</u> |
| 77 | G09 | 654 | 53 | 655 | 200 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |

| | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----------|----------------|--|
| 78 | G10 | 737 | 255 | 741 | 161 | same ORF hit | Met was found in ORF |
| 79 | G11 | 696 | 68 | 667 | 199 | same ORF hit | Met was found in ORF |
| 80 | G12 | 392 | 75 | 264 | 62 | other part hit | Truncated? |
| 81 | H01 | 745 | 110 | 583 | 157 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met but contains frame shift</u> |
| 82 | H02 | 714 | 188 | 715 | 175 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 83 | H03 | 689 | 230 | 689 | 153 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 84 | H04 | 691 | 65 | 568 | 167 | same ORF hit | Met was found in ORF |
| 85 | H05 | 617 | 15 | 618 | 200 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 86 | H06 | 689 | 89 | 670 | 193 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 87 | H07 | 661 | 16 | 467 | 150 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 88 | H08 | 593 | 33 | 453 | 139 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 89 | H09 | 725 | 72 | 729 | 218 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 90 | H10 | 678 | 17 | 679 | 220 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |
| 91 | H11 | 796 | 108 | 798 | 229 | same ORF hit | Met was found in ORF |
| 92 | H12 | 739 | 12 | 672 | 219 | same ORF hit | <u>match start from 1st Met</u> |

4) FOX Agrobacteria library의 작제

가) T-DNA 발현 vector에 cloning한 산물의 품질확인

확인한 14 clone중, vector에 insert가 삽입된 수는 13 clone(93%), 삽입되지 않은 수는 1 clone(No. 6)이었다(Fig. 2-10). 다음으로 insert사이즈를 확인하였다. 그 결과, 13 clone중 No. 11, 13, 14는 약 1 Kb정도로 동일 완전장 cDNA가 삽입되었을 가능성이 의심되었다. 그리하여 이들 3 clone에 대해서 재전기영동한 결과, 이들은 서로 다른 사이즈인 것을 확인하였다. 그 결과, 13 clone은 모두 서로 다른 cDNA가 삽입되어 있었으며, 그 사이즈는 0.9-2.2 Kb이었다. 이상의 결과로부터 강발현형 binary vector로의 삽입 공정은 완료되었으며, 예상 유전자수의 약 10배인 115,000 colony의 집균이 종료되었다.

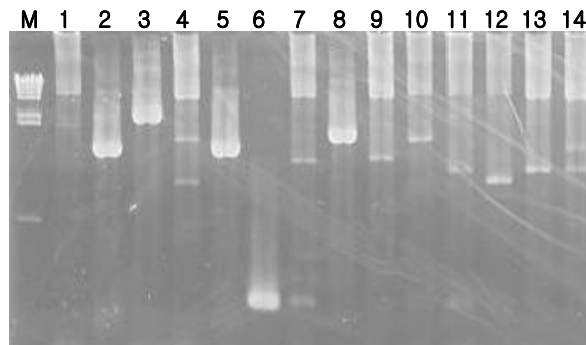


Figure 2-10. Size check of insert DNA from clones checked in vector of T-DNA.

>IP002N01-QC-A02:

```

ggaagctggtgcagatagagtttcaacttcacactctctttcgtcttaacagctttaatgtagatctgtctcttacctcgtcccgaagtct
cctctccttcacatacccttcgaatcccctaaccaatcaaatcccacactctagatctcaatgccgtctccgtacaccaagcgtcgtcc
ctctccgcgcctcgtctgtcaccctcgggtccaaaggaggattctttataaacctatctctattcactctgtttctcctcgccttgcgct
gttcccttctcaggctccggagttcgtcggcagcagacagtgctcaccaagttctgggaactgattcacctcttttctcgtcggcattg
ctgtcgtttaggtttgttagccgtaggagtggtgaatcatcgttgattcgaggacgagccgtgtagtagatgagtcttccttgtctt
atgtctctagtttctcccggtttctcgtgttttcgacgaggattcttgtgattttaggagttatgagagtaatgtgagtgctcgaggttct
ctagctgtagtgaatgagagagaatctgagctttcaatcaaatgcaagcttggaaactcgcagtattaccaagggagatctaaggtt

```

gttgggtgctcgaccagattatggcttgatggccatggtgtgcaccagccattaggcttgcgggttaggagtttaaggt
>IP002N01-QC-A03:
gtcgagctctctctgtgatggccgatttggccctcgagctctctctccctccacttctctctcctaataatcagcatcaatggcg
attaccttctcagatctacacacagaggaaggcctcaaatccgtggaggagcacctcggcgaaaaaacctacatctcgggagatca
attgtctgtggatgatgtgaaggtatacgtgcccgttccggtgaaacctagcagatgctttccctaagctagcaggtggttcgattgc
gtcgcttcccatctagctaaaagcttccctggaaaagccgttggagttagatcgggtggctctgctgctgctcctgctcaagctg
aggcacctgcagcagctgcagctgatgatgatgatgacatggatctgttgggtgacgagaccgaggaggaaaagaaagcagctg
aggagagggaggctgccaagaaggacacaaaaagcccaaaagagagtggaagtcctctgtgctcatggaagtttaagccatgg
gatgacgagactgacatgaagaaacttgaggagtgtttcgcctgttgagatgcctggtcttcttggggagcttcaaaactggtt
ccagttggttacgggcatcaagaagctcacgatcatgctcacaatcgttgatgacctcgtgtcccagacaacctcattgaagactac
ctcacctgtgaacctaaacaggtacatccagagtggtgacatcgtcgcattcaacaagatctagagacttttaaacctc
>IP002N01-QC-A04:
actgacatcaccgccttggagaagccccagtagccctcgtcgcagcgaacccctcattcacgaaagtcgtcgaaacttcagcgtc
ctcgattacctcgtttctccaccatcaccggcgtttccgtcaccgtcggctacctatcagggatcaagccagggatcaaggaccgt
cgatggtgacgggaggactgatcggactcatgggagggttcatgtacgttaccagaactccgcggggaggctcatgggcttttc
cctaacgaaggcgaggtcgcggctagtcaccagaagcgtggtggttcttcaattgaaatctaggggcttctggtctctgtttgt
tttaaaaaaaaaacaatcttttcttgaattggattgattttttctctgatattattgctggtttgaggatagcttggctctggtt
tctgttatgatgacttatggttaaaaaaaaaaactgactttctcgtaaaaaaaaaaaaa
>IP002N01-QC-A05:
aacctaaaaagctagagagatggacagtggtgccacttaccagagattcccaaaggtgaagatccgtgagctgaaagatgac
tacccaagttcgagctgctgacaccgatgtctccatggcgaacgctctccgtcgcgttatgatctccgaggtcccacggctgca
atcgtatctggtcgaatcgaggtaattcctctgttctcaacgatgagttcattgctcatcggttaggtctcatccctctaccagcgag
cgtgcgatgagcatgcttctctcgagactcgcgatgcttgcggcggagacggacagtcgagtttctctggtttagttctctta
ggcctaaatgtgactgacaaaccttagatgttactagtaaggatctgtacagcgtgactcctactgttactcctgttattcggtg
attcatctggagctgattctagcagcaaaagaggaatcatcatagtgaactgagacgtggacaagaactgaagcttagggcgata
gagagaaaggaatcggaagatcacgtaaatggtctcctcgaccactggtacgttcatgtatgagcctgacattatcatcaat
gaagatatgatggacactttgacagacgacgagaagattgacttgattgagagcagcccaccaaagtttt
>IP002N01-QC-A06:
ggaagctgtgggaacatgagaggtcgtgatctgataaacaatggcttgcggcgaactcatcctcgagatcttcagcgcactcga
ttcgaaaccacccgcgacgctgctcctcgtctgcaaacgatggctccacctcgagcgttccagcgcaccactctccgcacgg
cgcctcttttcccccgacaccatcgtcaccctcctctctcgcgcttctccacatcactccatccacatcgacgagcgtctcctt
tcctcctcctcctcctctcctcctcaaacggaagcgtgggagtaaaacgctcgtcgtcatcatcatcggtcttctcagtaaagctg
gaaagttagtataagacgcgttctggaggagctgagaacgctgagcttgcagcttgactgatgctggcgtgatcgctcttgctaa
cggttctctgattgagaattgagcttgattggtgcctaacggttccagcttgcgttcccttgctcagatagcacttccc
tcagatctctcgatcacgggttgccttgggagatcaaggcttatcagctgttgaaagttctgtaacctctcgaagagctcaac
ctgaggttctcgaaggttaaccgacgttggagttattgatcttggcttggctgcgccagtccttgaagtcataaggcgttgcgc
ctcggcgaaaagtgcaggatt
>IP002N01-QC-A07:
gaggttagttcaagagaagagaagtgatagagagttaaaccaagtcctggtctgagattcttcttattcatctgtgatcgca
agctctagccatattcttctcgtctgtctcaaaaaggtttcattacggtctgcgacaaagccgagctcagatgtgatctcgcgg
cgtctatggatggtggtgattgattagggttccatggcgttatgcttaaatgctttcaaacgagtgctatgtgggcttatcaatca
atagatagattttagttgaaagtatttgataaactgattatggttcttcttttcttcttctcattgtctacggttatggttatatttttaagaaagtt
tggtccttgattttgatttaggatataagtgattgctggaagttgcttcatcattgataatcgggatcagatataccgtagagtgaa
gattgatacattcatcagatgactgttttagctatcagttactttacttgggtggaagtatagcgaaggagttgcagaattataggtgtt
gcgaactgcgaagttgctggaagtatattgctggtgcctgtacaagacagtaattacaatggctcatacattgatcctacactac
aacctgagagcatgtgtgagagttagctctttcatcttgcctgacatctctatgtaattcataagcct
>IP002N01-QC-A08:
gatcttgtgactcttctctcagatagccattcaaccactacggttactaccagctccgtctccgaccgcgagagcaaatgat
cggcgacgctaaccggatcggaactgccttgggcttttcatgctcctcgaagatctcgaagagagttcttctcctcctcctacag
atgcagatcaagatgctcagtttccgtcgcagagaagaagaagagcttacccttcagaagtcgaggaagctttcaatgccgca

agaatctaatagcctggaggtgtaactccctgttcgagccttcaaatccgttgggtgggcaaccgTTTTgattgattcagttaaaggc
tcaaagatgtgggacatcgatggaacgtgtacattgactacgttggatccttggggaccagctatcatcgccacgctgacgacga
ggttctcgtcgtctagctgagaccatgaagaaaggaacgagcttggcgctccttctcttagagaatgttcttctgctgagatggtt
atctcagctgttccagcattgagatggttcggttgttaactccggtaccgaagcttgtatgggtgtgcttcgtctcgcagagcctt
cactaacaagagaagttcatcaagttcgaaggtgttatcacggctcacgccaacgccttccttgtgaagctggtagtggtgtagc
cactttaggactacc

>IP002N01-QC-A09:

ggtggagcccgttTgtaattgcggtgagagtcagaaatcttggagaagaaaaatagtgaacgggatccctagcttagcttggg
gattgatgttggacgactacgattgacgacgaccatggctattcgtccgtctcctgctcttcttcttctgctgatcatcgccgggaga
tggatcgtcttccgatggaagcagcggtggcgccgggaggaacggctactcggcgagcatggctgctcggcagttgctccc
tccaatgttggcttagctgctgctgacccgtcatggccggtctcgcctggcttccaccgtctactcccgtagagggagcattggat
caccttggctcactgaggagaaggaagcatgcgcttcaacctagtcagtggatgctttttcaccgaccaaggccgactcagtgatg
gaggtgtaagtttctcaagaaagttcgcagtgggggtgtggatccaagcatcagacctgaagttggccgttctacttggagtg
atgacttaaacagcaccgaagaagaagagattctattcgacagcagaacagaaggaatacgaaacctgcggagacagtgctc
gcgagattcataacgcaatgaaatggtgtgactcaaaccaacagctcagagaagcaacccgaaaacagccaggttcttgatt
caaatgatattgcagaagcaatagttcaagaga

>IP002N01-QC-A10:

ggaagattgttttagccatgactgctcttataccccatctccgaccttcttctactgaaaccaagcaccatctctgctgaacct
ccgatcatccacgactctctcagctcgcgacgcctctctctcctcgcctctgctcctctctctctctccaaccgatcccgt
ttgcttccggaatctcaggacctaaaggagtgggtgaaagatcagaagaagaagtcgtccaggttcttgttagctccattgatgctg
ctcgtgaaagcctccgctctgtttacctctctcacaactagagaatctgattatacggacaagatttggagagcctcagaacctg
ttaaggtcttctgcaagagattgttctctaaagagagaagctctattgtcgatttccagctctaaaccggagtgagggttgcacatt
caagcttgttctgaagaatgctgcttactactagatgataaggacctgtcactactaaagcagagaataactaatgatcttctgta
ggctcttggctctctcatgcttctgacgaatgggattgatatgaaccttctctctgatagaaaaagattgcagatgcagttatggag
gcaatcttcttctgacaagtttgagaagagtgcaaggactgccttgagatctgagattaagtgtggctggcttctc

>IP002N01-QC-A11:

ggagctgctattatcaaggccaggaagctgtctagtgcactctctgcagctagctctgcttgtgaccatataccgtgattgggtccttg
gaaccccgagggcacatttgttcaatgggagtatactcagatggatcatacaacgttcccgtggacttactctcttccccgta
acctgccgtaacggagagtggtctattgtccaaggttaccgatcgatgaagcatcgaggaagaagatggatttgacagcagagg
agttgaaggaagagaaggaccttgcctctcttagacctgttttctctgtgaaagatgataaaggagcttgttctgcaat
aatgatgcttgtttaaacctcatgagattaagagggctacttgttttctattgtgtgttctgctgacctataaaacagcaattgaa
tctttgatcaaaaaaaaa

>IP002N01-QC-A12:

gggtcacactcttgcgaagcacacaaaaaaaaaacccccaaatagcgtgaaagataagcctcgccggcgacgaaatcagggtt
catcgaacaagaagatggctcacgcttgcgtctccacatcagcttctctcaggtttacagccggattcgtctccgcgagtccea
cgcctcctcttctgattctcagaagcttccctccttctcagcctcttctgtaagaaagacgaagaagttgggttagcggcagaaga
cggctccgaaggctgtatactccggcaatgtctggactcgggagactcctcgcctcaaggagtttggccatcagagatgattac
aagtccttcttccgctatttctgtgtacgtcaaggacaaggaccctctatggtgcaagagcgttccagagatcataagc
cagctcttcaatataggattattcgttgggtggtgctgtggatgatgatggccaacataatcgtagctcagcttcttacctgat
gctgttgatcctactaagggtattgtcatgtatgtgaactcctcctgggtggatcagttacagctggtatggctatattcgatactatgagg
catatccgacctgatgtctcactgtttgtgtcggctctagctgctagatgggagccttctgcttagtgctgggaccaaaggga
gatacagcttgcacaactcaagga

>IP002N01-QC-B01:

ggtagtgttgagcacacacacacattacttgcctcctcgttctcgcagatactctgccgacatctgttaataaacacgtcttctt
cttcttctcaaaatgatcactcagcccgctctaccgattagatcggacggaggaaggaagaaatgtttttgttttgttttaa
tctcggatctgaaacgaaatcgatgggttcttctcagacaattctagggttatcgggatttgggataggatcagatgggctcg
tcatcggatacttcttctctactcagcccaacgacgtcaaggatcctcaaatcaatcagatagcagaccaagaccccaatc
catgctccgatgcttccgagatcccccttgggtcaagaaccccgactcgcacctgttgattggattaacaaattcatcagtaga
tgtggccttacctcgacaaggccatctgcaagaccgccaggaacatcgccaagccatcatcaggagcagattccaagtaca
gatcgactccgttatttcgagactctcactctcggctccttgcctcctactttccaaggatgaaggtttacctcaccgacgagaagg

>IP002N01-QC-B07:

gaaacaaaaacaatcagatccatccatcaaagggtttgagaagagagcttccttcacagtcgtgattccaaactccacaattcgattc
ccgatctgatggcagagatggatcccgaaggcatggacggagttcgcacacgctggaacgtgtggcctcgcaccaaggtcgaag
ccagcaagtgcgtgatccctctcgcgcctccatctccccgatccgctcgcactccgacatcccttctccttaccgctcccctcaat
gccgaacctgcgtctccgctcctcaacgcttcgcccgcgtcatttcgccccaagatctggatctgccctttctgcttccagcgcaa
ccctttccctcctcactaccacatgatctccgacaccaatctccccggcgagctttaccctcagtaactccaccggttgagtacgcgcttc
ttccaccgccggtcagttcgatcccagaaccggcgctgctccgctcacacgcctcctcctgttctgtttgtttctcgacacgtgta
tgatcgaggaggagttggggttcgtctaaatctgcgcttaagcaggcgatcgggttgcttccggagaatgctttgggtggggttcgtg
tctttggcactcaggctcatgtccatgagttggggttctcggagatgtctaaagtcttcttaaaagggaacaaagaagtctccaag
gatcaggtttggatcagtg

>IP002N01-QC-B08:

gattgtagtatactcagtcctcatatccctccaactctaagataagctctctcttttcttctcacttaaatgactggtttgacgc
ggaaaatcaaacagtcgccgacgacggcaccggcaacaaaacatgtaccggagttaggtccaccggtgaaaccaaagaggaaca
agatgcatcgcgtgtgcaatcttagcttccatgacttccatcctcttggttatgatataaggagtgatgagtgaggactgatttata
caagagagattcaagatcactgatctcaagtcagttctcgcggaaacttaacatttttctcactcatcggtcttctgcccgggt
aaaacctccgactggattggcggcgtaacacaatcgtgtttgccggagctatattctttgccggagcaatcctcatgggattggctc
ctaactacgcttctcctcatgttccggagttgtcggcgagtaggagtcgggtatgctctcattgacacgtctataaccgccgaa
gtcgtccggcatcttctcgtggcttctcactcctcctgaggtggtcatcaacgcagaataatgctcgggatgatcaaacctcg
ccttctccaagtttctcgaagcttgatggagattcatgctcggcgtcggatccgttccctccttactagcgcgacggcgttctcg
ccatgcccggaatctccacggtggctcgttata

>IP002N01-QC-B09:

gacaaatcaaatctgaactagagagttatccacagatccaaaagaagatgtcgtcgaaccaagaactaagccttaaggccgga
gaagccaccggtcaagttcagctgaagaaggagagtagtactgaacaaagtatcacacgcaatgaatgagaatgcagatcatcactc
aactcacacgcagaacatgatcagaataatccttcctaatttctcaggcctcaatgtcatccaacagacaggaggacaagtga
gaatattggcacaaggagcagcggacgctgtgaagaataactcttggaaatgagtcggccactaacaaccctagcaaccaggccgg
cacgaccaccgagcaaccctagctccaaaatctttaaaggagttgcttaagaaaacgttggcctgatctttcaacatacacia
aaccttattctcagttttgttctctatttattctgattttttttgtattttgttatttctgttttttttaacattttttgttattatgt
tgagacattattcgtctcactcatataacccttagtaaggccttatttattcttatgaatgatcgtaaaataatcatctttcttttt
gggaaaaaaa

>IP002N01-QC-B10:

gatcaaatatcttttttctcatcatatttctcacacagctattgtttatctctcttttgtttaaagtaacttagtctaaatcacgagatatt
gcagttttctgaaaaaatggaatttgaatagctctacaccaagatagactgtctcctcttggattggatgatactctttatccttta
agctctggtttatcacaagcatgcgccaacaacatcatagaatttatgggtgagaagcttggaaatagatgaagagggagtcgttgaa
ctaaacaaattctctataagaaatattggaacttcaatggctggtctaaaggctgtagggtatgaattcgacaacgatgagtagacc
gtttgttccaggaagattaccttatgaaaacttaaacggaccgggttctaaagaaatctcctccttactctaccttgcgaaaattggt
ttctcaaatggagatgaagttcatgtgaccaaggcgttaaaggctcgggatcgaagattgtttgagagaatcataagtttcga
gaccttaaaccttaagatcaacgagactttagattacctcctgagatccgggtatctgtaaaccagcagagagtgattcgagaaa
gccttcgacattgtacagctcaatcctcacacaaccttcttctcagcagagtgatcgtaacatccaaaccggaaagcccttgggtct
ccatacagctcctgggtgggttaaatccgaaa

>IP002N01-QC-B11:

gaatatcatcctccgcacgctcgtcacatcgtctgattcttgcgattcagaaaacatggctctgccgaaccagcaaacctcgatta
tcttagcttcaagctcgtcattgttgggtgacggaggcacaggttctctccgctttatctttcttcaatctgtgaagtttaacgtaata
ttgagattttgatgaggtcgttcccttgttaataatcatggtgttccgatgatcaatgattggctacgttcatgtgtgattgat
gatcgagatattgcgaattgaatcgtatataactcagtagttcaattgattccgtaagatgataagatttttctgaagcttgagat
ttctctctttgtggtgtgcagggaaaactacttctcgtcaagaggcatcttactggggagtttgagaagaagatgaacctaccattgg
tgtggaggtcactccttggatttctcacaactgtggcaagatccgttctactgctgggatactgctggtcaagagaagttcgggtg
gccttagggatggttactagtaagtagattctcttttcttatacttctgtatgttctcagtaatctccttggatcacttactagatta
aggtttaatatgtgattgtgattttgtatagctatggctatggttgaagaatctcctaggatcactttatagcataaggttaataata
tagttttgaatagctctggt

>IP002N01-QC-B12:

gatcactccgcggagtctccgaagcttctctgaaaggaacaaaagaaaaatgcagtcgtcaacgtacacggttaagcaaacgcc
gcgtttgcgtttcagcgcaggaccttcttaacaacctccacaacagatccgccactaccactaccggaatccgcttctgccactcca
cctccacctccactgctctgcttctacagccatgggagcgaagctcgcctcgcgccgagaacgggatccaaaccgttatgaatctctc
ctccgtcaaagctcgcagcagagcccaggcctcctctgttgggtgggtgatgaggaagaagctgtacctctgagatctg
aatcgaacggctccggcaccgtttgcggttcgttgccttggctgctatattgttggctatcaccttgggggttgaacg
gtgctcttgagatcttgcctaaggatcttggattgctgataatactgctcgaaggatggatcgttagcgcgctgcttgcctgca
acggttgggtcattcaccggaggaacattggctgacaagtttggacgtacaagaacgttcaattggatgctatcccgttgcattg
gagctttcttatgtcaacagctcagagtgtcaaacatgattgtgggacgtctgcttgcaggaattggaatcgggatctcatcag
cgattgtacca

>IP002N01-QC-C01:

gaagtattattttctcattctaccttaatatcgattaatccatttctttcgacaaggcggatttaacaaaaacacgcttcaatgata
tttcgattccattaatctatactctttgtctttatcaatcttttcttacaagaatataaaggcattaataatagaaaaattaatgtac
aatcgaaaaagtaattagtaaatgtgtgtttgtttctgaatgacgaattgattatcagagcacgaagaacaaaattctttgggtgg
cggcaatgactccttgaactcagtattcttgaagcctcttggttacttactcactcacgctgagagacatgggtttcaagtgggaacc
tgaagaaagggttgaatccactctccgtgctgatatggcttacttgccttacatgtcgacggctgttaaaactggcatcatcactg
ggatcatagctctcgtgaaggaatcgtgtgggaaggagcttgcgatgttaagaactacaacatagacggaacaaagaatg
ctcgttttggaaatgatgaacatcgttgggtccctcacatcttgttacctcacaaccggaccattttcgagatcggcctggaactcaac
gcggttgaagactgtggtgctgaacatagtgatggcaattg

>IP002N01-QC-C02_Fwd.ab1 PL-T1F:PL-T2F:PL-T3F

gagctacctcacatctatgttggactcgtgcataaatattgcacacacacacacacatagttcaattcaagcattacatccacgtctt
aagaaaaatggcttt

>IP002N01-QC-C05:

gttctggtcctcaactccacttcttccctctctccagtttgcctcgttggtttcaggcacgacgtcgtatcaggtcgttaggaagt
ttaccggggaatctcaggagagatccttaaccgtgtccgctgccgcagcagctgagcctctcacgctcctcgtcaccggtgctggg
tgaagaacagggcaaatcgtgtacaaaaagttgaaggagaggtcggatcagttcgtggcgagaggttgggtgaggacgaaag
agagcaaggagaagatcgggtggagaggatgaagtgtcgtcggagatattcgtgaccctgaggccattgctcctgctgttcaagg
gattgatgcttgggtcattctacgagcgtgtaccgaagatgaaacctggttcgatcctagcaaggagagagacctgagtttatt
ttgaagaaggagcctatcctgaacaggttgattggattggtcagaagaatcagatagatgctgctaaggcagctggagtttaagcag
attgttttggcgggtcaatgggaggaacaaacataaacaaccttgaatagcattggcaatgccaacatttctggt

>IP002N01-QC-C06:

gcctagcttattcacacacctcgagtttctcctctcgtctcttctcgaagaaagctgcggcccccacagcttccacaatggatcatg
gtcagaaggagaaaccgcagagaaatcttgaagtaaccttttcaagaaggagtttggttgcgaagaagacttcaacctcgcga
agcacccttggattgagtcagtaccgaacctgcaagtcattcaagctgatgcaatcctcaagtcgaaggatgattaggggagaa
cgttcgctggatgccattactattgggttttctaccaacgaaggggattttagttctttgaggactacccttaaccttctctt
gatgttggcctactttgaagaagtctcgaagccccattggctgctccttttgggtggggccacctggcgtatgcccaagag
gacctaggttgaaggtggagaccgtcctaggtaccgtgaccgtgatgggtaccgctggtggtgaaaggtgaaaagggtgga
gctccagctgattaccagccttcttccagggaaagtggtggttaggcctggttttggcctggtgctggagtttagcgcggctgcac
catctggttcagcttgccttgaagagaaatggttttagtcgacagtaagagagatggaggacttggtttcagctttaaatttgcctt
tataatcgaattctggagtatcttca

>IP002N01-QC-C07:

gattcaattgctggtaaggctcatatcatataaaaattacatacatctgtttacatttcttggatgatttttcttaggtaattatgaactg
gttaccgagaggaggttcaaaggtctctcagacaatttctttagatgtttcatcaacatctcattttccgctagaggacatcgaca
ccaccaatggtgaaggtgattgggacgctaaatttaagaactcagacctcctccatggatattgaccacttttccctctgagttc
aactcttggcgttgcagcaaacgggataaagaagaacgtatctgtttgaaacagctctgatgcttctgcagccttctgctggca
taaacgacactctacacaaatctcatcacatcatgatgcaaaagtctctaagctgtttcagttctcaagcccagtgctcagttctgaga
gcagcgcaggttcttctgccacagaactccacatctcagagattgactttccctgtgaaaggcttgaagaagcaagcgaacgcc
ccactacactgagacgtagacacctttaccgttttaaccggagaagctaaccggaggaattagaatcctctgagcaacatgcca
agaaagaacgcaagattttcaccaccaaccacacagtgct

>IP002N01-QC-C08:

gctctgttaatacaaaaacaaatctaaaaaaaatcagctcactctcattcaacagattacatctctctgtttcttggagcttgtgtcttacg

cgacgtaaccgacactccacattcgaaaacgtggagacgtggctcaaagaactcagaaaccacactgatccgaacatcgtagtca
tgctcgtgggcaacaaatctgatctccgccactcgtggctgttcagacagaggacccaagtcatcgcggagaaagagtctcttt
gcttcatgggaaacctctgctcttgagtcacgaacgtcgaggacgctttcgcgcaagtactcactcagatccacagattgtgagta
aaaaggccatggaagcagccagcgagtcagcta

>IP002N01-QC-D02:

gatccatcttcccagagagtgatagatagaaccggaagtggagcggaggagcggcggtttctagggtttcttgatgcaacgatggg
cacgagcagcgaccgatccaagacggttccgatgagcagcagaaacgatcagagatctacacctcaagcaccatggcagat
ctacgaatgaactggagcgtccgccgcgacaaaaagtaccgtctcgccatcaccagcctctcagcagtagtaccgaaccgagtc
gagatcgtccagctcgacgaatccaacggcgagatccgctccgatccaacctcgccttcagcagatcttacctcccacaagacc
atcttcatcccgataaggagtgccagcgcctccgatctcctcgccacctcagcagacttctcctgctctggcgaatcgccgacgat
cactccgcgctcgagctcaagtcgtgctcaacagcaacaagaacagcaggttctgtggaccgttaacctcttcgactggaacga
agctgagcccagacggatcgggacttcgagcaccgatacagcgtgcacgatctgggacattgatcgcgagggcggttgatactca
gcttatagctcacgataagggaagtgttgacattgcttgggtggagtttggtgtgttcgcgctcggtctcgg

>IP002N01-QC-D03:

tgatattcagggaaaggaggaaagatgctgagcttatcgtgagtaaatcatgttctcattaacgctctcagccaccacgaacga
agaactctcaatcgaagctcagctgccgatcttcctactgtttaccaactcttccgcgctaagctcgtttccaattctcactggag
ttgttgagtttccgctcttctcctccttcgcagttccggaatcagtagacgaagaccacttcgatgacgaattacgccgtctgctg
gcgctcgtaccggaggagatacagcggacgctggaggagcatcccgaatcggcgaactcattgaggtagtgctggatttaggg
cgtaagcctctggcgcgattcccttccggcgattttatcatctccgacgacgctgttagggttaaggatctgcaattcgcagctctca
ggttggtgagttactaacgataatcgagctggaatcagccggacactgcaccggattagtccataaggaaccgaaaggcgaa
atcattggcttgacttgcgctgttggtcgatctgttagaggaagcccaatttgcgctgaccttgcgaagatgggaactcttgg
acttattggtccaccaggtgttggtaaaaccacaatgattaggggaggttagcaagaatgctagggaaatgactatgagaagagag
gatgattgtgatacttcaatgagattggtgggggatggtgatatacctcatctggggattggtaacgctagg

>IP002N01-QC-D04:

ggcaaaacattcttttacgaagagagagacgaccaccgtcgcgggaagtacgtcactaaaaaaaaagtatcaatgggtgcc
cagagcctcgcggttgaagagagagaagaacagaaaagaagcagagaggagttaaggctgtggaggaggaggaaggagaa
ggagaatcaaaggataaagaacatcacagattcttggcgagtttaaacagattaaacccaacaacctcttaggatcatcgtaaca
atggcgggtggcactagattcactacgccgcttctcaagagctcctccgccgacgcagacgcctccaccgccgaagagccgcc
tcagccaccgccgtctcttctcctcaacaccacctcagccgcagccgcttcaacaacaatctcgttccatcttcacaccaacctca
aaccttagcatcactgaactcaacgaagtaacaaacaagttcttctcctcctctctcctccacaaggctgtggcattgcctttg
tgcttctcgtcttcagaggcatccaaggtctaataggctccaacggtaacaacgtcaaaaggaaagagcaaaaggatcctcaagttc
cttctccgcaagtcgaagtcgctcgttgccttagcatcatacttcgcttctcatggcaatggcgtttcgtctatggcctgagtttatg
atccactcactctggagtaccttcttgatgctttatcc

>IP002N01-QC-D05:

gggcccattgtaacctaacccaaccttccgacttgagaaagacgggtcttcgctagagaacatactaaggagatgagtcagag
ttgtgttcggatggaggagctggatttctcaagaatccaacgagtttccaccaagacgtggtggctatggcctggcacatgtgga
ttgtgttggaggcgtgcatacactaatgatgccttggtagactctatgccaagctcggccttcatcgctacaattggttagagggg
acaaacttgagctagatagcttaatgcaattcaacatgcgtagtgctgcacatccttactacatgaccttagttgcgcgcttccatcta
gcggttgcagcaaatcttcaggttctcgtagaggaagaacgtcttggcattttagattgacatgccccatctctagacctcaaggg
accgagacttcaaagaaagagtcactccttcttacgtccacattccgagccagtgctcaaaactaccaagacagattgcttggct
ggaccaggaacaagtcagcaattccatggcctccgcttccagtgacacaaagcagcgtttttacatggtgaatgaatcagattgca
atgtgattggatcgttgtatgtgaaacttgaactctgacttccataggaaaccacagctgaggaactcaacaactt

>IP002N01-QC-D06:

agtatgggagcacacatggcttccggtttcaaaagggtcgtgggattcaactctcgatcaatcacgtaaagagtgctgatcttga
gaccttgtcttcgccgaagcatctcctgtaagtacgggaaagactattcaggtttgggaagtcaagctgtggaagtcaaaaggaagg
gtcagagaacagaacgttaactctcctctatagtcacactcctctgtaattctcctgtccctgatcagtcgaagatgcttcggacc
tctcaaatgatctctaaatgtgaaatctcaagcttttttttaatttctatctctgtgattgtttatctgatcttgataatggcttttt
ttcgctgtgatgatcatcttcaaacacattaccctttttgggtgacaataagctttaaagtggaaggtttatttaggtcccttcgag
ctttggcggatgtcaagattcgtcactattgaaaagtttatcctccaaaaaaa

>IP002N01-QC-D07:

ggttcacaagcatttcactcgcacgaacacaaaagcttctcagattcaatcgcggttctctgagttgtagcgatgggttctgaa
ggaccaacggtagtgacaatcaacatcacagccttcaagaagttccatggagttgctgaaaaccaacggagaaaatggcaaca
acctgaaagaatatttagctaagaatcctcagtcgaaagacgttgttcttggagctgtaccgtgcttgagacagctggtaaggag
ctctcgttctctttatcagttactacaatccgcaattaacacgaaagaatcagagtcagtgacctgtgaaaaacatgggttct
ttggagttaatagtgccgctacgaaatcgcagttgagcaacaagctgtgaatgaagcgacgttccgttgcctgatgaattgggt
ggaagcctcagcatttgctattgtccctctgatggccaatctcaactgaagaaagactactgttctgtgaagagataacaaag
gccttggagaagaagggctttaggtgataacatcagatgatgcaggtcgtttgtgtgcaactatgtctattaccactcactgagat
ttgcagaacagaacaagacctattcactctttgttcacgttccctcttttcgtcgtgtgg

>IP002N01-QC-D08:

ggggctactgctccgacgaggagccaagaagacaacaatttaaagaaagagacgggtcggttgtctcttctcgtctctattcagctt
aactggggattctatttaggtgttaaagatgggaaagactccaagtcctggtaaatggatcaagctctcttctgggaagaagtc
atacaagtcagtttgagaaaaggaacgagaaattgagatctgaaagaaagaagagattgtggtagaaggtgaaggataaaaa
tgtctcagacttagctaccaatcctccggtactagttcatcacaggaagttgcagctacacaagctgtaacagctccagatgtttag
tccccgagaagcagccaagcgaagagtcgaatgtgaatcttagtcagggatgacacagaagaactcaagttcgaagaagctg
ctacaaggttcaagctgctgtcagatctcatcaggctcgtgaagaattacaaaagcttaaggtatcgtaaagctgcaagcagtg
tccgtggctacttggtagaagacaagctgttgcatactcttgcatttgggggaattgtgaagttacaagctcttctgtgggaa
ggaagctagatctcagagaccgatgatcaactcagaaaaaaactcggaaactgagaatctgaaacttgcaggagcactta
cagatggcttgagatcccacaagctctccatgattgataagcttctagtttcgtctccaa

>IP002N01-QC-D09:

gaatctcttctctcactcgttaatttcatctccggcgagttaatggcgatgcttcaagcgactcttggcttctttagttctccgacattt
tcgttctcttctcttattttttccgaatcttccagtcagtcgacgtcactctgtctgggcttcagctgtcgtccctcagttaaagactt
gatttttcgaaaaggtcagtagtagaagctacagaagagatgctagattacagtcagtcagatgttctcatcgtctgagctgata
atagcaatgcagttgtgaaggagaagagtgctcagtgattctcttagctggaggtcaagggaagagaatgaaaatgaccattccg
aaacagtataaccactccttggctcagcctattgcttgtacagcttttccctttcagctatgcctgaagtgaggagattgtatgtg
ttgtgatccattttccgagatattttgaagaatgaagactcaattgatgtgacctaaattcgtcttctcgtgtaagaaaggca
agattctgttcacagtgacttcaggaaattgatgtgaacgctgaacttgtttgcatccagactcagcaagacccttggtcgacact
gaagatgtcagaaggtgcttaaaga

>IP002N01-QC-D10:

ggtgtagttgttaagcaaaaaagagagatagagagaaatggctagcttcaccgctccgcttccacctctcggtcgtcgtcct
gctctccttcaagcccaccgtcggctctctgctctgttcttggtttgcctccaatgagtaagaggaagggaggagtgaaagct
cgatggagaccaagcaaggaaacgtctcagccgtgggagctggagtttctgcccggctacagcagcttgacagctgtgatga
gcagcccggctatggcttgggtggacgacaggatgtcaactgagggaaaccggcttgcctttggacttagcaacaaccttggga
tggattctttgggagtggttgggttgatctggactttctactttacctacattcatctctcgcagaggatgaagaatctggcttctact
ctaaacatgaactatataatgttctcatcagtgctctctctcttccatttctgtgaggacatgaaccaaacagtgattctggtt
acttgaatttaagcaaacacaaaaaaactattttcaaaaaaa

>IP002N01-QC-D11:

gattactctgagattgatctgttttaagatttaaccagaccatctaaggatctggaacaagctccgttgcctgatcaacagagga
atacaaaaaatggagcttctcatccagatccacctccattgtctccaagatgagtttctggccgtagggatcgtcttcttggtttct
tcctcttcttacttccacagaagcatatgatgcgctagatccagaaggcaacattacaatgaaatgggatgtcatgagctggactc
ctgatggctatgttgcctggttaccatgttcaactccagaagtaacagacattccatctccaggatggacattaggctggaaatg
ggctaagaaggaagttataggtatggctcggagcacaacaaccgaacaaggtgactgttcaaagtacaaaggaaacctaccg
cattgttgaagaagatccaacggtttagattgtctccggggactccttacaaccagcagattgcaaaactgctgcaaaaggcgt
gtcctcaactcatgggttcaagacctggcactgcagctagctcctccagatcagcgttggcgctgctggaaccacgaacaaaacc
gtccgcgtgccgagaaactcagctcatgggcctgggtccaggctacatttgcggccctgctaagattgaagaccaaccagtt
tgtcaccggacactcgcagaaccactcagccatgatgacatgaacattacgtgcacatactcgcagttccttctcaagaaccc
actg

>IP002N01-QC-D12:

ggtccttaaacgcgtcaggagaggagaaatcagattcaatcggcgtctgacatcttaagatccagaactcgtcggaaaatgtcta
cgttcagtgccgatgaaaccgctccttcttgggttcttggcgtcgcgcagccctcgttctcctgcatgggagctgcatatgg
aacagccaagagtggtgtgggagtgatcgcagtgaggatgagacctgagttggtgatgaagctattgtccctgttgttatgg

ctggtgtttgggtatttacggttgattattgctgtatcatcagtagccggattaacccaaggctaaatcttactacctctcgacgg
atatgcacatctctctctggtctcgttggacttgctggtctctctgctggaatggcattggtattggtgatgctggtgtcag
ggccaatgctcagcagccaaagctttcggttggtatgattctatcctcattttcgctgaagctctggctctgtacggctcatcgtggg
gatcatctgtcctcccgagctggcagtcagccagagccgaatgaggaagagaatgattctttctcttgattcggcgtgattctttcttt
ggttttgccaccggctcactcttcatcgagccgggatctttttatgtattttatcag

>IP002N01-QC-E01:

gggtccacacttctgactcgtttccgatggcgatcatctacgcggttggtggcagggggacgggtggtactagcgaattcagcgc
cgtcacggggaacacaggcgcgtggtgcggcggatcctcagaagctttcggcggaaaccggcagaaagactctgtttctcc
caagaccgttacatcttccatctcagatccgatggccttacctctctgtatggccaacgatacctcggaggaggttaccgttt
tcgtattggaagagattcatatgaggttcataagaactacgggagagtggcgcatagtctccagcttacgcgatgaacgatga
gttctcgagggtttgcatcagcagatggagtcttctctagtaactctagtgttgatactctcaatcgtgtccgaggagaagtcatg
agattcagcgggtgatggtagataacattgagaagataatggagagaggtgataggattgagcttctgttgataaaacagcaacta
tgcaagatagtcctttcactcaggaacaatctaagcgttacgcagagctcttggtgaaaaacgctaagctcttggtaatgtg
acgtgcgtgatagttctgtgctgtacataataatgcgctttctgtggaggcatcatttacctctctgtag

>IP002N01-QC-E02:

gggggtcttccacatttctcgtgtcactgttcattgacatcgaaacttctcagccacagagcgcctgaacaaaatggcggcaa
tcaggacgatgacgaacttgatcatacgcgagttatccaccaccttactcttctcttcatcaaatcgtgccactctcttattcca
acgtccgtcgcactccgggatcgctctgggtcactcagttcccgatccgatcgcggcgtcgaattctggtggc
ggtgatcggaaagtttctcacggttctcaggtgcagcagatgcttcatgaggcggaggagagagctagctccgctggcaacg
agcctactcctcagatcactctagaccatgttacgcttaacttctctagaaagcgggtgctggaggccagaatgtgaacaaagtga
ataccaaagtagatagcgttcaatgtaaaaaacgctactggttaagtgagaggatcagggagaagatcttacagacggagaa
gaatcgaatcaacagggacggagagctgtgatacttcaacaaaaccaggacgcagaaaggcaacatcgacgatgacttgca
aagctacaggcgtattgatgcggcttcatatgtcccactccaccatcagaagaacagaagaagaaaatcgtaagatggctgc
aaaagctgatgagaaacggcttaagcaaaaaagtt

>IP002N01-QC-E03:

ggtcttcttcttctcaccactccaaccagtcacagtcaccagtcatacgtcactcggcagctctctctcaccgccttctgctcctcctcc
ggatcaaacattccacctctcgtcaaacccatctcaggtacgaaactagggttataaaagtccaacctttatcatcatcatcat
catcaacaaagtcacaacctttgaaccttcacagggttaactctataatggatgatcacactcacatcgaaaagtcacaacctttga
gcagaaaagatagagaagaccacaaaaggctagactttgctgggtggggctcgaagaatctgatccactttcaaaatcactcggg
agagacaccaccgacaagatctctgagtagatgttacattcatcgtgagaagatcattcgtgaggagctaacacatccttcgaag
aagaagacaaagatattaacttgcgatgtgaagctgcgtttgctttcgggtgcagaagataaacgtggcgaagctgcctgacttg
gtggctaagcattacgttgagaatcaggatggggaagagtttgattatctttacagctctgaggaggaggaggatgataagaagg
ggagggttggtttatcagataagggaggttgaggagaagaagcgtagaggaggtgtgctgcgatagtgagggataacgttaa
gctttttgatttgaggaagagttttggtgaggagc

>IP002N01-QC-E04:

gaatctaaccaacatcatctcctccattgctattcgttccgaatcatcagcagcagatgaggatcacgcagatcttatcatctct
gctaataatttactctctcagctcctcagatgtctcctccgatcagatcttccaagctcatctagtgggaacattcagccgaacaatcg
cgaaccaaagtagacatcgagtagctccccgaagacgcacctttccaccgggtgataatctggagtctatggtgatgcttgacaa
gcaagggcgcagattctgtgtttcttaccaaaaggaggaagaatcagtgaccggatggacctctacgcagcagaacatcagcactg
tgttgatggaaactgataaacagctcaagctcaagactcctgatgagctgctcagccactcaatgatcagtgcttcaaggcaaga
gggttggtgctgtagtattgtcatctgggtctgtaaggcagtagacgttgaggatggcaataagattgtgcaagagttgt

>IP002N01-QC-E05:

gaaaaatgcttgcatttttttagctaaatggttgcctcattcttgatttcctttggtgacctatcttgatctctcattttccaaaactattat
cttctcattaatcggaacatggttcttctgcttggctctcacataattacaccgtttcgggtccgaaacacctttccactcggttta
gtgctaaagccagcaatgttggttaacagtggtgcaaagcaaggactagctgctctatctttagctggtgactttgtcacctgtt
ggtactgccttaactctgagttcaatattacacaacgatggagcaccacaaagaaacttacgttggtgacgacgctggtgttcttagtc
gagtaacgcagatcagatcgaagaaactctgtctgatctgaatacaggaagaaactccagctcaatttcatcactgtccggaagc
tactagtaagcagatgcgtttgggtatgcagaccaggttctggagaaatggatccttcaatgaaagctgtaggtgaaaagattctt
gatgctaccgtctcggaaaatcttccgtagcttagccacagacgaaaaatacaatgaggcaatatacagcagtgcaaacgggttgg

ttgcagcaatagacggtctcccagacccccggtggtccagaagtgaaggataacaagagagaatcaaatttcaaacgaaa
>IP002N01-QC-E06:

gggagatggagaatccaatcatcgacgcatgttccgagatttctgcgcttctcatgggattctcacagttgaagatttcttcttcatgac
ctctatgaacttgctgcgttctgctgaaagagaagcgaatgctggttagattgaaggagggtatcactgtgatgcttcttggtagaggtt
aagtgtcgaccattgtgaacgggtatggagttgctggaggatctacagcgtataaacatactctatcgagtggagacaacgggacgg
actcgttacttcaaggtgggttactgtgaggggtcagctgacagagcttgtggaccatcgcttctggtaaaacacaatttgtatgagag
ctgctgagcgtggcagagaagcaagatgggagggtttttatagacacgggaactctttctgagagacgattgctcagttta
tctgtggcagttcggatgcttctgcttacgaaagagagcttgagcaggatcatgtcacacggctctatgacatctatacaatgttgat
acgctgcaaggtctagaggttgcgttgaggtctcaggtgcagatgaatgtgaacgaataccgggtacgattgttagctgtgattcaa
tctctctgattacccaatctcggaggcagtggtcacagggaccg
>IP002N01-QC-E07:

gagtgcagagagagagagaatttgggtgggggagatggaaggcgtagggtcgagattgagccgaacgtcatcgagatacagt
ggtccggctgcgacggcggtttcagcgccatgtaaggaagtggaagaagaagtgggtacgtgtctccacgtcaccagtcggc
gtttccgagcatctaaatccaacggctgtagcaacaacaacaacagcagcagcaattctccacaccatctgcttctccataagt
ggacccacttccctctgacgctaacggctccgggtgagacggaggagccctaacgaagattcagatacgtcctattgcatg
tttgagcatagggagagagtggtgctaaggattctgaggttgaagcgggaagagactgacgaattcgacaatgattctccttggc
taaagccgttggctggacatgaacttaactgactccgaccaactaaggaggcaaaaactcgtcactgaaactgggactgtgtct
taattctgaagggactgaagaagaatgaagagataaatcatgctaaactgagggatgaatcaacaataaaaaagtctcagattggg
gttgttggctacctaccatgtctcatagtttaactcttatagatcctctggatctgtatctgtagtagtctctagttagaagaag
ctatgtgatgatcaaaagcctggctccatcagaatcaaatcatatcatcctatgttccattgtataactaatgaaaatttggaaataa
a

>IP002N01-QC-E08:

ggccacacaacaagacattcttcttctctctcgtcagctcctacaacaaggcggaagaatctctccctcctcttgaccttctctt
ctccatcgattcccttggagttcaaaaatggttgaacagactcagcaaccgtcgattttccagaaggctgcttctggccagctcatgag
ttctggcgttctcaggacatccatggctacgcatctggtttccagaggcgcgacgtacggaaactactccaacgctgcgttccag
tacctctcgcggctacttccaggattgtggcgaactactgcttctcctgtgctgcaagctccaagtgagaaaggatttcttag
cttcgctattgatttcttgatgggtgggtgttccgctgctgtgcttaagaccgctgctgctccattgagcgtgtaagcttttgattcag
aatcaggatgagatgcttaagcgggtaggttctgagccttacaagggtattgggtgactgttccggcaggactattaaggatgaa
gggttgggttcttggagaggaaactgctaactgtatccgttacttcccactcaggcattgaactttgcatcaagattactt
aagaggctt

>IP002N01-QC-E09:

gatgtctgcgtgtgtagctccaatacatgcaaagtaggcattgaaagagagataaatgagttggttggtaaggaaagaagagg
aggtgcatggaagcaaggatgacgtcatcagcactctactaactctttgccatcatatctctactccttctctatcttctaccac
gttacaggtacgaggttgagaaaaccaccacaatctcaactcttctattgttctcccattcttcttcttctggttctctac
aattagtcacatgagttcttctcagatcctcttactacgtcagagcaaacaggctgcatctcttttggagaaggccacttcttggg
gagtggttcttctgcttcttcttactgttttagtttcaacaacttacttctactccttatggtagccgatctttagatcttaatttatt
cgccacaaatataatattgagattgatattggttcttgaatcaacttaactctctacacatgtacaagatataatggtctcaactag
gtttgctatattgttcttagtaataataataactgtgtgacaaatcgagatgaaatattgtgcgacaattagaaaataacagtttgggt
gtaacgttttattagagtagaaa

>IP002N01-QC-E10:

ggctagagacagagagagagagagagagagagagagaagaatggctgcttcagtgtgcttctcatcggttacgttgaaa
cctgcgggttccaggtggagaagatgtcggtagaggattgccgtcgtcacaagagctccttcttcttcaaaatcgctcgttagt
ggcgttaagaagatcaagaccgacaagcctttgggtgtaacggcagcatggacttgaggatggctcgacgcctccggcagaa
aggcgaaggatattggtgttcaaaatcgttgacaagtacggagcctaactggatggatacagtcctatctacaacgaggacgag
tggtcagcagtggtgatgtgtacaagggaggagtcaccgattgcaatctggcggtgacactcgccggaattctcgccgga
ggagcttcttctgtacaacacaagtgttggctcagtaaatctataagatattgtgttaactcatgtttgtgttattcttcttctaatg
ttgtgaaaactcataacttgaatctataagaattatagctagtgttgatacatattcatctataggtgaacaagaacttgaata
caacattatattaagccatctcgccgccattatctggcgggtgactaaaaaa

>IP002N01-QC-E11:

ggagtttcttctatgttcgctacgactcctatctaacttaaatcatcatccctgtgttggcttctttaaagaacttcttccaagcaaaagc

tcgaaaaacaagaagtaaaaggtatggcgtcgaacaacagcaacgatgattgtatgctgttcttggttgaacaaggaatgtac
ctcgaccgaacttcgactgcttataagaagcttgccttagatggcatccagatcgttgttcatcgatgggaaacttgagttgtag
atgaagcaaagaagaaatccaggctattcaagaggcttactctgttctgtctgactccaacaagaggttctctatgatgttgagct
tataacagtgatgatgatgtcgaggacaaaatggaatgggagatttctgaacgaaatggctgcaatgatgaatcaatccaagct
aatgacaataattcaggggacagtttgagcagctacaagattgtttaacgagatgttcaaggagacgccggcattcccacct
catcatcatccttctgcttcaacttgccttcttctgttaacttgtctttgatacaaaactatcagcagtcaccgttgggatgggctga
tggggactagcgatccttcggattgactcaagatctcacaccttctttaggggtgggacatcagcaggattcaagaacgagaa
gaacatggtgggagaaggaacagacggaagacatgctcaatcttctacactatggagtcctacttc

>IP002N01-QC-E12:

gatcaaaaaaaaaacttcaaatccctagaaagatgtcgacggaggaagaaccaaggtggttgtcgagt caggagacgccgaa
gccccgggtgacggagaagaagcctgctgcgaaaggcggcgtaaagctaagaagacgccggcgaagaagaagcctgctgctg
ctccgaggaagagaaccacttctcaccctccttacgaagagatgatcaagacgcgatcgtgacgctgaaggagagaaccgg
atctagccaatacgcgattcagaagttcatcgaggagaagcagaagtcgcttctccaacttccaggaagcttctcctcgtaatctc
aggagactcgtcgttccgggaagctagtcaaaagcctccttcaagattcgtctcggcgtaaaccggcggctacgactaa
accggttaacaagaaccagctgctgctgttactaaaccgaagggtaaagctcctgctaaggccaaccggctgctaaggagcc
aagaacctgctgctgctgctaagcctaaggcaagacaacagcaacaactaaagccgctgcgaagcccaaacctaagacgaag
agtgtagctgctgttccgaagaccaaggcgggtgctgcgaagcctaa

>IP002N01-QC-F01:

ggtattgatctcgattacgtacggacgcgatcagacgacgacgacgacgacagggggaagaaaatgccgggtgagagttgtg
gagagcaacgcggctccccaggttccaggaatgatcctgggaatcgatcaccacttccgcctagctcacttctcggcggccga
ggcgtttctggtacgcaaaatgtttcaatcaacagaaggaggaagcttgagagtaaacgtccagatacagggagttgacctg
agcatggctatcttgtgactatggaagcttaaacgttccatggcagacacacctgtcataacattctgggaaggggagattgt
ggatgaaagaattatacttttacaccgaaaatgggaagccacgaggaagatgatagagacattggtcaaagtcccatcttt
tgcaccttccagggacaagttgaatctgacgggtgggaggaactggatcttagcaattacccttacatattatgagatgaaagag
caatactttgtaaacgttgccacagattgtgactaacgatagctggattctactacgtgtgcttctcctgcagcagcgatccatcag
cggcttctactatgatcctaacagcagtcgcttcagaagctggagctgaaaacagttaacgaaggaaggtctggttccagcttctt
cttccagattgcaatgatgaaagcaaaagaaaaaacgacgacagcgcctatgat

>IP002N01-QC-F03:

gatcttctccccgaagaaactccgccgatcttccgagcgaagagt caccgaaaaaatggctctccggctagtatccgccaccg
taatcctctcctctacttactaatttccgctcagctctctgattccaacaccacaagatcgaaggaccgatcaagaccatagctgtt
agtcatggagaatcgtccttcgatcacatcctcggctggctcaaaccaaccgacccgaaatcgacggcctaaccggcaagagat
caaaccctcaacgtctccgatccaaactcaaaaagatctacgtctgaacgacgccgtttctcgcacatggatccaggccactc
gttccaagccatccgagagcagatattcgggtccaacgacacttccggcgacccgaagatgaacggattcgcgcagggaggcga
gagcatggagccagggatggccaagaactgatgagcgggtcaaaccgaggtcttcccgtttaccagagctagcgaacga
gttcgggatattcgaccggtggttcgctcgggtccgactcagactcagccgaaccggttctacgtccactcggccacctcccagg
atgctccagcaactcaagaaggatctcatcagaggt

>IP002N01-QC-F04:

gacgcacaccgtagtctccatcgtctctccagcttcttcttctcgtctctgaaactaatctgattcagccatggctaagcagcgtcag
gcatggcagtcacgatgactgcaagctcaagtttctgaactaaaggcgaagaggacataccgttggatcgtttacaagatcgagg
agcagcagaagcaagtgggtgtgagaaactaggcagcctggtcaatccatgatgactttgcagcaagtcttccagctgatgag
tgccgctacgccatcttcgatttgcattcgtcactgctgagaactgtcagaagagcaagatttcttcatcgcaggtcaccggacac
agcaagagtgagaagcaagatgatctacgcgagctcaaggacaggttcaagagagagctagacgggattcaagtagagcttca
agcaaccgatccaactgagatggatctcgatatttcaaaagccgagccaattgaggaacgggtgtatcaactttgttgccttctgta
ccagagtgcacatgctttatcctaaagtttgcgtgacggatccaacaaaacagcttcatttgatcgggtcttcttccagtgctttttt
gggttcttacagtgcttctgtaaaacttaagagatttggctgtgctctttataatcgtgtaagaaccgtttatcaacagatgatcctat
tgggaacaaa

>IP002N01-QC-F05:

ggggcgcattgtaacctaacccaaccttccgacttgagaaagacgggtcttctcgtagagaacatactaaggagatgagt cagag
ttgtgtccgatggaggagctggatttctcaagaatcccaacgagttccaccaagacgtggtggctatggcctggcacatgtgga
ttgtgttgaaggcgtgcatacactaatgatgccttgggtgaagctctatgccaaagctcggccttcatcgtcacaattggttagagggg

acaaactttgagctagatagcttaatgcaattcaacatgcgtagtgctgcatctccttactacatgaccttagttgcgcgccttccatcta
gcggtttgcagcaaatctttcaggttctcgtagaggaagaacgtcttggcatttttagatttgacatgccccatctctagacctcaaggg
accgagacttcaaagaaagagtcactcctttcttacgtccacattccgagccagtgctacaaactaccaagacagattgcttggct
ggaccaggaacaagtcagcaattccatggccctccgctttcagtgacacaaagcagcgtttttacatggtgaatgaatctgagttgca
atgtgattggatcggtgtatgtgaaacttgaatctgtacttcccataggaaccacagctgaggaactcaacaact

>IP002N01-QC-F06:

gacatccgagtcctcccggagaaatcgatcgtagctctctctctgtgcctcttgccttcataagatcacatccctcgagaagaa
tccaaagtaaagcttttaaaaaggactgctttcatttggatgggaagtctctgtggttaaacttcattagtgatggaggcacaatc
atctacttgagcaggaagcatacaccgctgttttaagggcttttaagcgcagctctgatgctatttctgggacaaagaaagtctgata
acagatttgcgtagagaactaagggtatctgatgacgaacatcgagagcttctgagcagggtcaataaggatgataccattcaacg
gataagagattggagacagggaggcgggaagccaagtcccttctagacatgcaactaatcagggttttgatggttctctagccaac
tttctcagcttcccggagaagaacagaagccatttcaatcttccatcggttgggtcggctgggaataggtcattcaatagctggtgtg
accgggtggcatttcagcaatgaatctgccgaagcattatcggaagaaaagtgtggacaaaaaggcctgaagacaacaactttat
gaagcaattattaccagtcacaacgcagctgagggtcggcatgcttttgggtgatgatatacacgcagcaaatgagacgtgggaat
ggggttgatctcaaggaga

>IP002N01-QC-F07:

gatccagaaggttcaacatcgcaagacgcaagccatacctcatatcggtctttctttgataaatatcggaacttctcaagctttactc
tagtattctcagccatgaccgctaaggatccttttcttcatattttctatctgaaaataattatattaacttaatgatctttgattgatc
gttatatataataaaccatttagtcaaaacttattcataaatatacaattataaccatactgatctcaagtttgaattacagaagctgtg
ttgcaattgagtgccacgatgagaaaatcaggaagaaagcgtttgtgaccgtctctcgatctcaaggggttacttcgataacaatg
gatgacaaaacagggaaaatgacagtagttggagaagttgatacaccgggtctctgatgaagctaaggaaactgtgtaatgcag
aaatcggttcggttgaagttgttaaccacctgagaaaaagcctgaaccggcgaaccggctccagctaaacctgatacaactaac
cggctgaaattgttgccttccagttacgcatatgaactaccgctaccaatattctctctatgcgaattcgcactatcagccatac
ggaattctagagttgtggtggaggaaccaaacacttgtgtgcttgtgtgatttaacagctagaattattttaagtaaggtagttgtg
atacttagtttgggggagtgat

>IP002N01-QC-F08:

gtctaattccttacttatccgaatcttctagggttccaaggatctaaccacaagctcacacaagatggacatgtatgagcgcgttgc
gaagccgaaggatgagactccgattgctgagaacgagattcgtatcaccagtagggtagggcgcgaaactgcatcacctatgcc
atggctcttctcaggaaaaaggatcggatgaagttatttcaaggcaatgggaagagctatcaacaagagtgtaacattgttgag
ttgattaagagaaggattcctggtcttaccagcacacatctattggatccacagacataactgatacctgggagcctaaagaggaa
ggcctcctccaattgagacgacaagacatgtgtcgttgatcactataacgctttcgaagaaggagctcaacacatcctctggttgat
accagcctccgattcctattgagatggtgaagccattagctgagattgattacgaagcagagatggatcaccaagaggcagagc
aagaagagccgaggaaggggtggtcggggaagaggtggcagaggggatggatgtgaacgttgagtatgatgacggggag
gtatggaacctgagcgtccatctggtagaggaagagg

>IP002N01-QC-F09:

ggcatctaaacgtcctctctctcttccatcctctctctctctctctctcgcgcgctcaatgcttcggtttcgattctctctctct
tgaccttcttctctctcttcttcttcttctgctgcaagagaaaggtaagaaaccgaagctgaggtcaacgacgattccagaagctc
ccatcccctcatggactctgcttccacaaccgctgtggttacgggagagaatgggttacgggtggatcctttctctcgaggctt
gcagaaccctcgccatcgctgacgattttcggtgaggtgacgttcaacggttcttacagagccaagagcagcagcagttcgag
ttccagcgttttctacttctatctccgcttgcgctcaccgtgtgctagccactacggactagctacatctgttcaagacggcggcgt
tgatgggagcagaaacataatcctcgtgactaaaacagcggtagcaagtttctactgttaagttgtctgatatcccgcggctaac
aatcagagagtggttaagttgagcacatgaaagtccatcaagactcgaccttcaaaggatctggattcgaggggtggtgaagctg
agaagaacgtggtcctcttaggagtggtgaagagaggaaagaag

>IP002N01-QC-F10:

ggttttggataagaaggacttgctcctccgcccacaacaacaagagaagtagaaaatggtgtctctgaagatccagaagc
ggctcgcgcgctcggatgaagtgcgggaaggcacaagatggtcctgacctaacgaatcctccgacatctccatggtaactcc
cgccagaacatcaggaagctggtgaaggatggttccatcatcaggaagccaacgaagatccactctggtccagggctcgcgctat
gaagatcgccaaaatgaagggcgtcactctggatggtaagaggaagggatcccgtaagctaggttgcgactaaggtgctt
tggatgcgtaggatgcgtgttctcagcgtctttgaagaagtagagagctgaagaagattgacaagcacatgtaccatgacat
gtacatgcgtgtaagggtaacgttcaagaacaagcgtgtcttgatggagagcattcacaagtcgaagccgagaagggcaga

gagaagactttgtctgatcagtttgaggctaagagggctaagaacaaggctagccgtgaaaggaaacacgctaggagagaagag
cgtcttgctaagggtcctggaggagatgttccccctgcaactgcaccaccagctgctgctgctactaccactactactgctcaactg
cagaggtaccgaagaagaagtctaagaagtgaaggggataaagtg

>IP002N01-QC-F11:

ggtggagaattaaaggagaagaagaagaaaagattatctggtgtgtttcgatggcgatgacagtagcagcttcgtcctctgt
ggcagtgatgattccacgtgtcacctccgtctccgaccgcttctccgcccgttcttaccttctccgctgctgctccttttggccg
atcctctttcactgttccgccgaagctagtttcaggtaatggtttgcagaaggtgaattgatgaagatgagagcttctcatcagatg
agacctcaacgtccattgacaccaacgaacttctcacagactgaaggaaggtggatggtcttgagaacaagtcgactgtaataa
tatatggaggaggagccattgttctgttgggtatcttccattgttgggtccatcaactctgttctctgcttccaaagttatgga
acttgttggctcggctacacagatggttctgtctacagatacctccttcaagtcagtagaaggaactggctgaggatattgatt
ccttgaagaagaagatcgtgggaccgaatagattcttttaataataaaaataaacctctttatctggaattttcttggatgta
ttattgtacaatc

>IP002N01-QC-F12:

tgaggctcattcggagtgtcttccaggccaagtgtctgaaacgggtgaacaagttgcaattaagaagttctgcaggataaaag
atacagaacagagaacttcagatcatgcgcttgaagaccaccaatgtcgtgcggctgaggcattcttctttcactactgac
aaggatgagctctatcttaacctgtccttgagttgttcccagactgtatacagagcattaaagcactataccaaaatgaatcagcat
atgcctattatcttagttcagctctacactatcagatctgccgtgcgctgaactactgcatcgtgttgggggtgtgtcatcgtgata
tcaagccacaaaatctactggtcaataccacacccatcaataaaaatgtgattttggaagcgaagatgttgggtcccagggtga
acctaacatatectatataatgctcccgtactacagggcccagaactatattcggggcaacagagtataccaatgccattgacatgt
ggtctggtggtgtgttatggcagagcttttactcggccaaccactgttcccggggaaagtggtcattgatcagctggtggagattat
caagattctgggtacgccaacgagagaggaaatacgggtg

>IP002N01-QC-G01:

ggagctgttgaacttagaagtgatccaattcatctgcttcttctctgtttctcccaattaccaaaagaccaaccgtgaacg
aggatgatcgcaaggcggatctggcggagccatcggtttctccgccattcagctcgtcttctgcttgcgctccgcccgttctgactc
cttatcattctcagctgcttgcgctgcgcccgttcttcttctctctcctgatgaaatggtctggaggaggaggaagtagaagc
ttgtttcgaacgaagccatgtccatagattcaaacgcaggaggaggttcttctgctgctcactcgcacaaactggggaaggtatt
gctgaatgtgagcttctcaagtggttgtcaaagaggagatcctgtggaagagttcagccactctgtgaagttcagagcgataaa
gcaaccattgagataacaagccgttcaaaagggaagtagctctcatttcacatgctcctggtgacattatcaaggttggagagactc
tggttaagctggctgtagaagatgctaacgatgctcttcaagatcctctgatactccaaaaatgtagaacctatctg

>IP002N01-QC-G02:

gaaaagtgcattagtgcaaatctaagaagagacagtgatcggctcggagatagatgccgactctagtggagaaaacaggaagccg
accaccgtgggtggggttagcagccgccgctgggtccagatagctgctggaaccagttcgacgttcccgtgtactccgcccgt
ctcaaatcgttctggggttcaaccagcaacagatcacgacctcggcgtcgttctgctgctgggtgaaaacttggggctgctcca
ggttacgtaagtaacaagctccctccatggcgatgcttctcatcgatccactcttgtttctcggttacagtgcttctcggagctcc
gtcaacaaatcatccatggcttgccttctggctgctattcattgctctgttttccggccaatagtagctcatggttcggcacagcat
ctcttgtactaatataggaacttccaatgagccgagggcccagtagcggggctcattaaaggctatattggtctcagtggtgcag
cattcaccgtgattttcagcgtcttcttaccattcagctacgaatctgctcttcttcttattggttggcgttccccttttctgcttatctc
catgtatttctccgccctgttctgctaccgacaatgaccttctgaacctgtttatttctg

>IP002N01-QC-G03:

gagggtccttgcctgcacgagagattatccttccaacatcggttaagtaataatcttccgatctgtacgtatggcggcagagcagaa
ggcgacgacagaagaagtaaagatggatctgttcgaggacgatgatgagttcaggagttgaaatcaaccaagattgggtgga
gaacgaggagcaagtgaaaggaagttggtctgcaatgggaagatgactgggacgatgatgatgtcagtgacgacttctcgcac
gctaaggaaggaacttgagaccatttctgctgataagaaatgaggtcttctgatttcttacctccttccctgcacattttactc
ttggatgcaagttcctatcttctgctgataataatctcaacttttatgattgccttttcttctaatgtgttgcctggttaagatgttctaatg
ttagataggtaaacgttatggatcttgaaaaaaaaaa

>IP002N01-QC-G04:

ggccgtcccaaaactcgtcttctgtaactgcacacaaagcagagagaagaagagagaagcgtgaaatataagggttctctg
atcggaagaagacggaaggaaggaatgggagtggtctcgtaccacggacgcaacgattgatctagatgagcagatctcgc
agctcatgacgtgcaagcccctctccgagcaacaggttagatcgttatcgagaaagccaaggagatcttaaggatgaaagcaac
gttcagcctgtgaaaagccctgtgacaatctcggtgatattcatggacagttccatgacctgctgagcttttccgtattgggggaat

gtgtcctgacaccaactactgtttatgggagattacgttgatcgcggttattattctgttgaaactgttacgctgttagtcgccttaag
atgcgttatcctcagcgaatcaccattcttagaggaaacatgaaagtcgtcagatcactcaggtctatggattttacgatgaatgtct
gcgaaagtatggcaacgcaaatgtttgaaaaatcttacagacctcttcgactatctccattgacagccttggttgagtcggaatatt
ctgccttcacggtgggattgtccatccatcgagacccttgacaacataaggaactttgatcgagttcaagaagtgccccatgaag
ggccgatgtgtgacttattatggctgatcctgatgaccgttggtg

>IP002N01-QC-G05:

acgggcgaactttgctgatagaccttacagtaacaagaacaagaaaaattatggtagctcttctggatattaacactaagtca
gttattagatctcccacagtggtatactgcatttgaatgttactgtttatattcacttgttgtaaactcttcgctcgggtcaggttcaacct
gtcggattacgtgtgtggggcataggaggggatagggtgatgatggctcacactaagccaaccactgggggtgacctgacgtagc
gtggttatatgtgaagggtgagatctacagatgctcctcctgctgtggaataagtagcagcaagagctgatggtagaacgag
gagaggtgatcaccaacaagtacactccaaaaacgctcgcacaggctaagttattagctaacaccaagttcacaggtgatgat
gtccctggagagacctggcacatggttttcagacataaggtgaaataccgtacaggggaaggccaaagtgttggtgtgattgcaga
tgggattgacaagaatggatagcctcacaaggagagctttactccattgcaagcagcgtcttggtatcctcggcaactctgaaac
cgtttctgtgtgaaaagactgtttacactaatgatgcaggagaggtgttaaggagttgctcaaatttctgtgtga

>IP002N01-QC-G06:

gaagccttctcagcttaaccggaaccaggtttaccactaccagaccaatgcaacaagctaaccggaccgggatgtagatctct
gcagctccctctcaggttatctcctcctaaaccgtgctgattccaccgatgctcaatcggcgccacctctccggcgaaaaccagcaag
aacggcgcaagagagcccagctcgtaaatccgatcgtcttctgaatctccatccacctctcagatcactccgtgtacccccagctcc
tccacctctcagatccatcaccatcacccccgtgtgaagtagcacgggctcctcctctgaacgcgcccggagaatctctcgtcgg
accagaacgcccggcgtgaaatactcgtgaagttcgcgtggcagtaactcgggagctccgatcgttttcgaccccagattcgtcctc
catagcttgccgatgtcgtcgacgacgatcagatcggagtcgaggtagatcacgcgctcagcagggctccaacatgtcagcca
agtagttctagcgtaaatcaacggctgctcgaggggctcctcacggaggtcgagatcatggaccgcacgatctccggatcgaa
atagt

>IP002N01-QC-G07:

gagactacgctatctcctctcttcgcggttcagatgctaacttacgcccggaggtaaaatcgaagaagaaggcgtagtataa
taaagaagcagaagttaaatacagaacaagcgtatcttagcctccaccatttcaaaactctctctcgttcgttctctgtgctcatc
atcactatcaccagctctcgtctctgcatcatatcatctgattcgatggctgccccaccagctagagctagagccgattacgactatct
catcaagcttctcctcatcgggtgatagcgggtgtgggtaaaagtgtttgctgttgaggtctctgatggctcctcaccactagcttcat
caccaccattggaattgatttaagataagaactattgagcttgatgataaacgcatcaagctccagatttgggacactgctggtcaa
gaacgttttcgaccatcaccactgcttattaccgtggggcaatgggcattttgctggtgatgatgtcacagacgaaacatcctcaa
caacatcaggaactggattcgtaatatgaacagcagcgttcagataatgtcaacaagatcttgtagggaacaaagctgatatgga
cgagagcaagagggtgttccaacatcgaggggtcaagcacttgcgtgatgaatacgaatcaagttcttg

>IP002N01-QC-G08:

ggcagttgtcttctctcgtcctcaaacacgaacaatggcgagctacttgactcactcacaaccagaaacttctctcctaaaccataat
ctctaggatcctctcctcctcctccttctcttcttcttctcgaatatctaccctttctcctcctcctcgttctcttactctcaciaa
aggctgcactcccgttcccttaccctgtcgcagcaactctcagatggctcctcctcgaagacgagctagagttcgaggaatccgaa
gaagacagctaccctgatgagtcggatgaagaagatgacctctccatcgatatctcaattcttgagaaagaagcgagagacatcgtt
agagactacgctactactctgtctcgcgagctcaaaactcgaggatgatgtagttgaagggaaggagtcagtagaaagggaaga
ggcaagccaaaaataaccagacgcagataaccagagcatcttctcctcaagaggtgctatcgttgggaaggccaatgtgggcaatca
gcttgtcaaccgtcttgttggggagaataaagcaatagtgtggatgagcctggagttactagggatcactgtacggtagatcct
actgggggtgaccaagatgttgggtgggactggtggtggtatgactgtttctaagtcgccagctggtg

>IP002N01-QC-G09:

ggagcagcaactgatctcgggctcagctattgattccagacatctcaaaaatggctgtctgcaccaaattcagggttttacagaac
agaaatgttcagtgatcaatgtcctcgatcatgtccacaaaacttttcattgggtggcctatcaccgggaactgacgataactcctt
gaaggatgcttctctaccttcaacggagtgactgaagcaagagtcagacaacaaagtgacaggaaggtcaaggggttatgga
ttgtcaatttcacaagtgaggagctgccaatctgctatctcagctatggatggacagggagttgaatgggtgtaacatcccggtgg
atgctgcaaaaagaatggccaagcttgccttatcttggatgagggtagaagatgagaagaaggcaataagatggtgagccg
atctgtatggaaagatccttctgtgacgcttcttgatgaagaagaagaacgcagctctgaacaggaaaatattgtaaggagatc
gaccattctgccagagatgttgattcgtcgggtgagaatctacaatggcaaaactcacgtgcgttgtaagatcactgaggggaaagt
tgggcataagttggagagtttgcgtttacaagaaaagtaccaa

>IP002N01-QC-G10:

gatgaatctatatctttacccaaaagaacagatccacaaaaccgaccgatccgatcgagcccaagcctgagcaaaatatactctcgct
tcttccaccgattgaaggggaaacagtgctcagatttggcgctggcattggctcttactagtgaattagctcagaaggccggcca
ggcattgcagttgatttcattgaaagtgttataaaaagaatgaaaacattaatgggcactacaagaacgtcaaatttatgtgcgctg
atgtcacatccccggatatgaaattctcaaacgagctatggatctgatcttcttaactggctgctcatgtatctctctgataaagagg
ttgaagatttggcgaaaaagatgttacaatggacaaaaggttggcgggtatattttcttttagggagtcatgctttcatcagctctggtgac
aacaagcggagtaacaaccaacacactaccgtgaaccaagttttacacaaagctttcaagaatgccatagaatgacgatggt
gggaactcgtacgaattctctttggttagctgtaaatgcgttggagcttatgtgaggaacaaaaagaaccagaaccagatctgctgg
ctttggcagaagaaagtcatctcgataatgataggggcttccacgcttcttggacaatgtccagtataagtctagtggatcttacg
ctatgagcgtgctttggacaaggcttggag

>IP002N01-QC-G11:

gatctccacaacctttcagactttacgacgacgaagacgagccgtcggtgtagaatacactaagaggatgagtcagagtggtctac
gaacggaggagctcgatcgtttcaactaccctgaagggttgcacgaagacgtggtagctgtgcattggcacacttcgagtgtgaa
ggcaagtggggaagatgtatggcgggtatcctaactctgctttggtgaagctctttgccaagctcggccttaccgatacaattggt
tagaggggaaaaactccagtttggtagattaaagagattcaacatgggtagtctgcaactgcctacttcatcactctggttgcacg
ccttccaaccagcatttggagcaaatctttcaggtttagtgcgaagaagaacgcctcgggtattctagacttgacgtgccgtcattcta
gacctcatgaagggaccgagagtttaagaaggagatgccttccttacgtccacatgccagccagtgccctacttctacaaagc
agattgttgattggcctctcagatctttgcttggcctctctttcagtgacaccaaacggttttacttggatgaatctgagttgca
atgtgattggatttcttggatgtggaacttgaactctgtactttccataggaaaaataaagctagggatctcaccaagt

>IP002N01-QC-G12:

gagctgacgacgcgcgacggaagaccctgctgagacgagcgcgacaaatctccggcgggtcaagccgcatcatgatcagc
gctacacagttctccggcaaatcggataatctgggttactgctcgggtcaaaactccggcgtaacgctgagatattcgcgccatg
gatcacaccaagagatgtaaaagagagagcctttacgtatcaaacgaagaaccaagaagcatggccgaggagaatcgatcgat
agaaactgaagaaggaagcttttttttttttttttttttttctgaattattattgttattttttttttttataccggtttgaagatgagaga
gaatacaaatagcaaaagtaagtttatatagaaaaa

>IP002N01-QC-H01:

gagctcttctcacggaccacatctgttaccttcaacaaaaatccccacccttcttactcatcatctccctctctcttctccacttca
tctgcaatcgatacagatggcagcttcatctactgtcttgcggaaacggattgtactacacacaaccaaacacaagctaagcaaa
cactttccacgcagacagattggcttttctcttctcagttaccagaacatccaaggtaatgtcgtgaaggcttctctggacgcgaagag
acacgaaggaagaagagactttctcaaagtcttgcggaaacgctggaatcggttgcggaagcggcaagcaaacgccgca
gaagaacaacaagaggatgcttcttctcagaggatgtcgtactctaggttctcagagtatctggacaaggacagggtgagtaa
agtggatctctacgagaacggtacaatagctatcgtggaagctgttgcctcctgagttaggtaacctgtccagcgcgttccgcttca
gctccagggttaagccaagacttctcagaagctgagagccaagaacattgacttcgagcgcataacgctcaggaagacca
aggctctgtgttcaacttgattgggaatctcgtttccctatgcttttgattggcgggttcttctctccagaggtccctcggg
ggaatggcgggtccaggtggcggcggccgcttctcagtttg

>IP002N01-QC-H02:

gatccacaaaacaaaaaattatagagaagataagtcgaaaaacatccttctttgcttcttctggacaaaagaggactccaaaa
tagggagctttatacaatctcaggaaggcgttactaatcttgagatgggttcttgttaaaagctcgtggcttttagtctctaaagat
tcaattctaattggagcctccaaaggatttcgagcttcttgttgaattcttatacttctccctatttcattggattgctgttctgggtt
tcatcaaaggtgtcgtttgtcccactcgtatgcctcgttgcacaataggcaactctgcagtcataactaagcttttggccgttactt
cgtttggactttctaatagtgagagccaagcaaataggacatatctgaagttcttctatgcttatgtctcctcgcgccatcattc
tttggctagttcttggcattttagcaagtgttcttggaggagccttatacggtttctctcccctatcttgcaccctttgacgccgttggc
gagggcaagccttacccttttccactgcttctacgatggaacttggagcacctcaagcgcagcttaccgctcgtccgtgacttcaa
agacgtgtgcttccactcctacttctcgctaagatgagcttaaatatgtcgcctgatcagaacattacagataa

>IP002N01-QC-H03:

ggaatgagttgtccttctccatctgataatcggatctcggctccctttagaagcagtccttctccattacgtaattcacaaaaagag
acttgccttcttacttcccagttacttgttggaccaagaatcagtttccatcacactctgttgatagataaagcaagcagtagg
aggctgtttgttctgttgcactgaatcagttccggataaagttgaaatggatgcacctaaggaatatttctcaaggactacaccaa
gcctgattactctttaaactgtggatctgagcttctcttaggtgaagagaaaaaattgtgagctccttaatacaggtttccctcgt
agttaaaggatcctctgctcccttggctcctgaatggcagatgacttgaagctacttctgtcaaagttgatggcaagcttctgaaggaa

ggggattaccagttggactctcgtcatctcactctgccttactgccggccaaggagtctttgttctggaaattgatactgagatata
ccccacatgaatacttcaattgatgggctctacaagtcactctgggaatTTTTGCACACAATGTGAAGCAGAGGGTTCCGAAAAATC
acattttaccaggaccgtctgacattatggcgaagtacacatgccgtgttgaagctgacaagt

>IP002N01-QC-H04:

ggccttcagcgaagaaaactctctcctcggattgttcagacaaaaaccctaaaaagctagagagatggacagtggtgccacttacc
agagattcccaaaggtgaagatccgtgagctgaaagatgactacgcccaagttcgagctgcgtgacaccgatgtctccatggcgaa
cgctctccgtcgcgttatgatctccgaggtccccacggctcgcaatcgatctggctgaaatcgaggttaattcctctgttctcaacgatg
agttcattgctcatcggtaggtctcatccctcaccagcgcgctgcgatgagcatgcgcttctctcgagactgcgatgcttgca
cggagacggacagtgcgagtttctctgtttagtttctttagcctaaatgtgtactgaccaaaccttagatgttactagtaag
gatctgtacagcgtgatcctactgttactcctgttattcgggtattcatctggagctgattctagcgcgcaaagaggaaatcatcat
agtgaactgagacgtggacaagaactgaagcttaggcgatagcgcgagaaaggaatcgggaaagatcacgctaaatggtctctt
gcagccactgttacgttcatgtatgagcctgacattatcatcaatgaagatatgatgggacactttgacagacgcagagaag

>IP002N01-QC-H05:

gaagcaatcctgaaatggcggcggtctgcagactaacatccgaccggttaagtttccggctacttccgagctctcaccaaaacaat
cttctcccgaccctttagagtgagatgcgccgtcttccccgggaaaaagagatacaacatcactctcctcccgcgacggaa
tcggctccggaggtcatctccatcgtaaaaatgtgcttcagaagctggctccttggaggtctggagtttagcttccaggaatgcc
tgtaggaggggtgcttggatttggctggagtgcttggctgaggagaccgtctctgctgctaaagaatcagatgctgtgcttctt
ggagccattggagggtacaatgggataagaatgaaaagcatcgaagcctgagactgggttcttgaactcgggctggctttaa
agtcttctgataatctgagacctgctacggttctccacagttagtggatgcttgcacctgaagagagaggttgcagaaggtgtgat
ctgatgggtttagggagcttacaggaggtattacttggagtgccaaggggcattaagactaatgaaaatggtgaggaagtgg
cgtataa

>IP002N01-QC-H06:

gaccagaggtgccagacttttgttcttctcacttttagtcttaacgttcttcttttttttcttccgggttcaagtcagctatggtg
gctatggcctctgcttctggttctgttcttcttcttactgatgcttctagttctcccgtatcagacgcgagctgggagctttagtcttcc
tcttagcacagtacgtttggatttgcgataagccaattataaatcttcagcgcactcagattatctgggttgaagcctcgagcagcaa
acgctactgctgtggagaatgtaagcaagattctgacgaagttccaactccagtggctataatcgaccaagattctgacctgacg
caaccgtcgttgaagtaacattcggagaccgtctcggagctctacttgatactatgaatgcgctgaaaaacttgggtctgaatgctg
caaggctaagtctacctcattcgtctggcaaacacaacaatttggcattactaaagcggatagtggaagaaaagtagaagacc
tgaattgctcgaggccatccgtctcactgtcattaacaatttctcagtttcatcctgaatcaagttctcagttggcaatgggagcag
cttttgggttcttccccaaactgaacaggttgatgtggacatagcacgcatataaaaattgaa

>IP002N01-QC-H07:

gggagagaccagaccatggcggcggaagaagaaaacagattctactcgcggtactatgtcgggcacaaggggaaatttggaca
cgagttcctggagttcgagtttagaccggacgtaagctccgatcccaataactcaactacaagaacgatacgtatccgga
aggaggtgttctcaccctccggttctcaaggaatgcaagcgtatcgtctccgagagcagataatgaaagaagatgatttaagt
ggccggaacctgaccgtgttgaaggaagagcttgagatcgttatgggaaatgagcatalctccttcgctacttctaagattggtt
ctctcgttgatgtccagagcagtgatgatcctgaaggtcttcgcacttttactatcttcttcaggacttgaatgtcttgtttttcgcctca
tctctctgcaactcaagatcaagcctatttagagaagaaccaattgagttaccgggagggagcatgtgcctcaagtttgggtgctatt
tgcgttcttctgttgtttgttacctgaaaaccctgagtttctcgtatgctgtttatttcttcttcttttgggtgcaatgaatcttaaatg
agcgttggattggaaatggtggacacaacggttggtaaa

>IP002N01-QC-H08:

gcctagaggagacagagagagagagaaaagcatggcgagattcacggtgttgattgcggcagcagtagtcttcttagtggc
agcggcgggtgccggaagtacggcggaagaagtatttagttggcgcaaaaaagtttggaaatccagacatcaactatgacacctgg
gttcagggaaagcatttctaccttggagattggctctatttctgtactacagagaccaacaacattcttgaagtaaacagaccg
actacgaaagatgcatctccgaccatcctatccgaaactatacacgtggagctgggagagacattgtccctctcaatgtcaccaaac
agtactatctacttgacggaaggggtggttgttttaaggcatgaagctcactgttacagtcgagaagcttccccctccaccaaatc
tgccctgtcaagcattagatctgttccactacaaggttcaaagcatcagctggttgttatcctcttttgttgatattcttttctat
gagtgatcttgttcttataatgctgcttctttcataagacctaaattttaaaccgctaaaaaaa

>IP002N01-QC-H09:

ggcggctgcacggtgaaggaaaaaaaacagagaaaacgtcgaacaggtccgatcatctctgatcgtcttccatggcgcagatccc
taacttgagaatgctcctcctcaatctcaaatccattagggagaagtctcagcgggagctcgtaaacttgcctaaagacattcgtgga

화는 전 세계적으로 농업의 저해 요소로 작용하고 있으며, 토양내의 높은 염분은 삼투 스트레스뿐 아니라 이온 독성을 나타내어 식물의 생장과 발달, 농작물의 수확량을 결정짓는데 가장 큰 저해 요소로서 작용한다.

작금 국내 농업현실을 살펴보면 낮은 자급률에 따른 식량 수입 세계 2위, 다국적 기업에 의한 국내 종자시장의 잠식, 그리고 대책기관이나 대학에 의한 소규모적이고 영세적인 농업 관련 기술개발 등 산재된 어려움에 처해 있으나 현실적인 대안이 없다는 점이다. 실제로 2006년 12월 영국 인디펜던스지는 세계식량농업기구(FAO) 보고서를 인용해 앞으로 30년간 심각한 식량위기 가능성을 경고한 바 있다. 인구증가나 분배 불균형에 따른 식량 위기는 아프리카 일부 국가에서 나타나고 있는 현상이지만 가장 중요한 문제는 한발, 고염 또는 냉해와 같은 환경스트레스에 의한 곡물 수확량 감소에 따른 식량 위기이다. 작물의 생산성을 위협하는 외부 환경스트레스로 인한 경제적 손실은 연 100억 달러에 달하는 데 이것은 병충해로 인한 손실의 규모에 비교할 때 작물에 따라 5~15배가량 높은 수치이다. 식량의 과잉생산에 따른 저가 공세에 도 불구하고 심각한 식량위기는 여러 군데에서 감지된다. 구소련이나 일본에서 대홍작이 일어났을 때 세계 식량가격 폭등, 이상기후현상 발생 시 유럽연합의 농산물 수출금지, 그리고 인구 10억의 중국이 이미 농산물 수입국이 된 점 등을 근거로 볼 때 식량 생산의 주도국을 쥐고 있는 일부 국가는 환경스트레스에 의한 농작물의 수확이 격감되면 언제든지 담합하여 식량을 무기화할 수 있다는 점에 주시해야 한다.

따라서 생태계 교란 및 생식체계 파괴 등 일부 위협요소를 내포하고 있음에도 불구하고, 식량안보 및 종자주권 확보를 위한 유전자변형 작물 개발은 피할 수 없는 국가 전략사업이다. 2007년 한국과학기술정보연구원(KISTI)의 보고서에 따르면 2007년 현재 상품화가 허가된 유전자변형 작물은 전 세계적으로 17작물 70품종에 이르지만 거의 제초제 및 병저항성 작물이며 주식인 벼의 경우는 비타민 A가 강화된 Golden rice 정도가 상품화를 준비하고 있는 실정이다. 사계절에 따른 환경변화가 많고 중국 등에서 유발되는 황사나 대기오염물질에 노출되기 쉬운 국내의 현실에서 환경스트레스 내성 작물의 개발은 반드시 수행되어야 할 사업이며, 피해의 심각성에 비해 개발 속도가 느린 환경스트레스 내성 품종 개발의 선점을 위해서라도 인적 물적 자원의 과감한 투자가 요구된다.

본 연구팀은 배추류 품종인 'Osome' 완전장 cDNA library로부터 부분적인 염기서열을 결정하여 식물유전자원을 제공하고자 하였다. 그리고 작제된 FOX cDNA library를 데이터베이스 검색을 통하여, 기존에 알려진 유전자와의 상동성을 조사하여, 배추 유전자원의 일부를 선별하였다. 중금속 및 스트레스 저항성 관련 유전자를 분리하여 염기서열을 결정하여 GenBank에 등록하였다. 중금속 및 스트레스 저항성 관련 유전자들의 기능 규명을 통해 궁극적으로 내염성 및 중금속 저항성 작물 개발의 토대를 마련하고자 한다.

또한 'Osome' 완전장 cDNA library로부터 다양한 스트레스 신호전달에 영향을 미치는 유전자, 단백질 및 small RNA 연구를 통해 환경스트레스에 적합한 형질전환 품종을 개발하고자 한다.

나. 재료 및 방법

1) cDNA의 5' 및 3'말단의 염기서열 결정

가) Alkaline lysis 방법에 의한 Plasmid DNA의 추출

FOX-cDNA library를 LB 고체 배지에 streaking 후 선별한 single bacterial colony는 ampicillin 50mg/L을 포함한 LB배지 5ml에 접종한 후 37°C incubator에서 200rpm으로

shaking하여 16시간 동안 배양하였다. 배양액 1ml을 1.5ml 튜브에 분주하고 4°C에서 12,000rpm으로 1분간 원심분리한 후 상층액을 완전히 제거하였다. 먼저, E. coli의 세포벽을 깨트리기 위해 침전된 cell에 차가운 상태의 GTE solution I [glucose 2.25g, 1M Tris-HCl (pH 8.0) 6.25ml, 0.5M EDTA 5ml per 250ml] 200 μ l를 분주하고 침전물과 잘 섞이도록 강하게 흔들어 주었다. 그 다음, 세포막을 깨고 DNA를 변성시키기 위하여 solution II (0.2N NaOH, 1%SDS) 200 μ l를 첨가한 후, Chromosomal DNA가 잘게 부수어지지 않게 5번 정도 조심스럽게 흔들어 주고, 마지막으로 Chromosomal DNA를 재생시키기 위해 곧바로 solution III (3M potassium acetate pH 7.5) 200 μ l를 첨가하여 tapping하고 -20°C에 5분 동안 보관한 뒤 4°C에서 12,000rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 깨끗한 DNA를 얻기 위해 상층액과 PCI(Phenol/Chloroform/ Isoamylalchol, 25:24:1)를 500 μ l 넣고 실온에서 12,000rpm으로 5분 동안 원심분리 하였다. DNA를 침전시키기 위해서 상층액에 100% ethanol 1ml를 첨가해서 30분 동안 -20°C 냉동고에 보관한 후, 4°C, 12,000rpm으로 15분 동안 원심분리 하여 plasmid DNA를 침전시켰다. 그 후, 70% ethanol 500 μ l를 넣고 tapping하고 다시 원심분리한 후, 상층을 제거하고 마이크로 튜브 안에 있는 에탄올을 완전히 없애기 위해 Kimwipes 밑에서 일정 시간 동안 건조시켰다. 마지막으로 Chromosomal DNA와 함께 남아 있는 RNA를 제거하기 위해서 RNase(10mg/ml)가 첨가된 TE buffer(pH8.0) 50 μ l를 넣은 후, 37°C water bath에서 30분간 반응시킨 후, 완성된 DNA sample을 -20°C에 보관하면서 다음 실험에 사용하였다.

나) 제한효소 처리 및 insert DNA 확인

추출된 Plasmid 3 μ l에 제한효소 *Sfi*I (8units/ μ l, TAKARA) 1 μ l, 10 \times buffer 2 μ l를 넣고 멸균수 14 μ l로 최종 부피가 20 μ l로 하였다. 50°C에서 2시간 동안 반응시킨 후, 0.8% agarose gel상에서 확인했다.

다) 염기서열 분석

염기서열은 (주)솔젠트에 의뢰하여 λ -pFLCIII-F Vector의 multi cloning부위의 양측에 존재하는 5'말단배열 결정용 primer로서는 5'-TGTAACGACGCGC CAGT-3', 3'말단배열 결정용 primer로서는 5'-AGCGGATAACAATTCACACA GGA-3' 혹은 T7 promoter primer를 사용하여 자동 염기서열 분석기 ABI3700 (Applied Biosystem, USA)로 읽었다(Fig. 2-11). 얻은 염기서열은 NCBI의 website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 BLAST 프로그램을 이용하여 분석하였다.

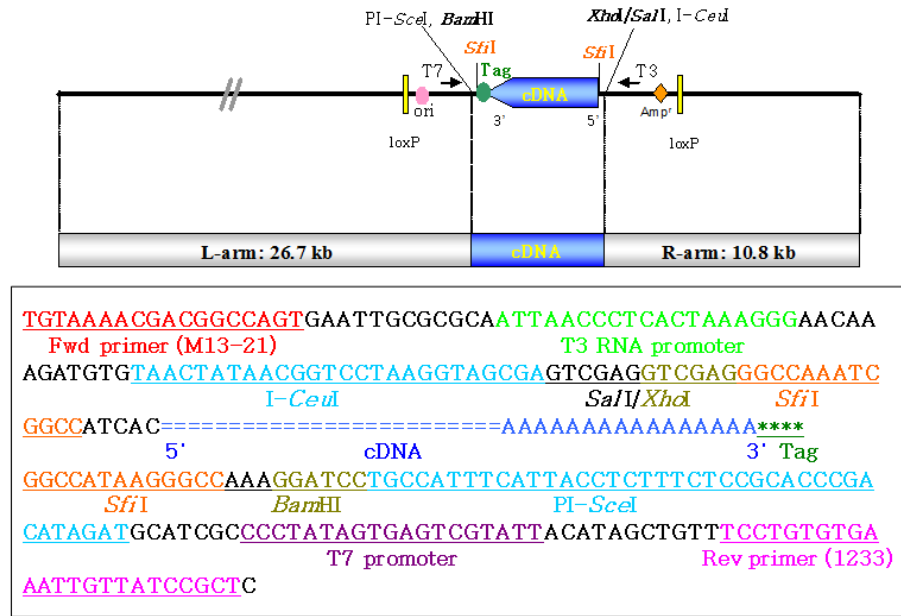


Figure 2-11. λ-pFLCIII-F cDNA(*Sfi*I, 4bp Tag) map and sequence

다. 결과 및 고찰

- 1) cDNA library 품질 평가를 위해 210 clone insert DNA 분석(1차 실험)
 cDNA library의 품질 평가를 위해 210 clone을 Plasmid DNA 추출한 후 *sfi* I 처리 결과 다양한 크기로 insert DNA가 존재하였다(Fig. 2-12).
- 2) cDNA library 품질 평가를 위해 1,000 clone insert DNA 분석(2차 실험)
 cDNA library의 품질 평가를 위해 1,000 clone을 Plasmid DNA 추출한 후 *sfi* I 처리 결과 다양한 크기로 insert DNA가 존재하였다(Fig. 2-13).

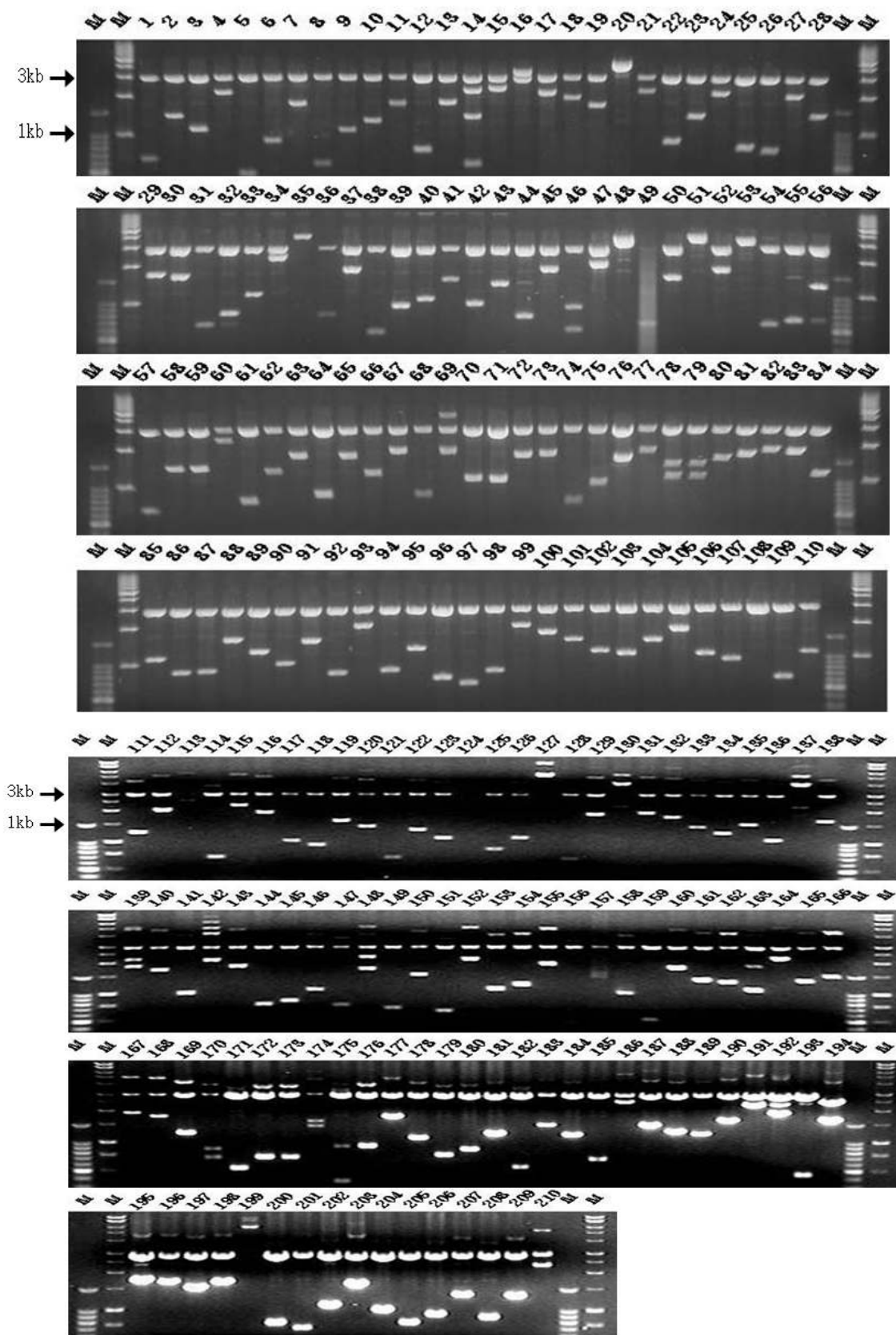
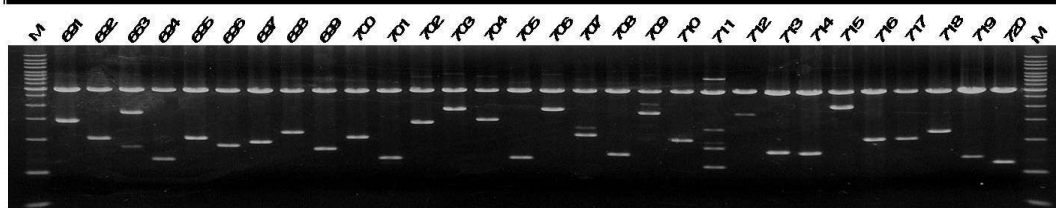
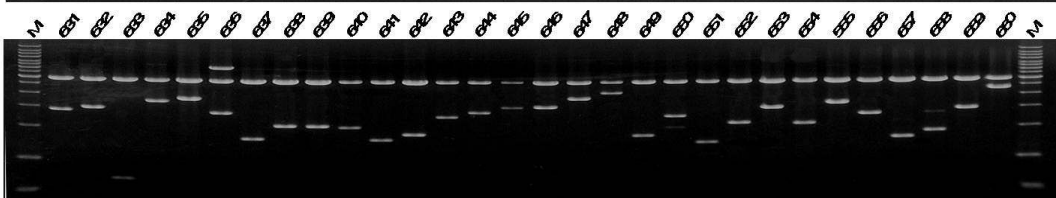
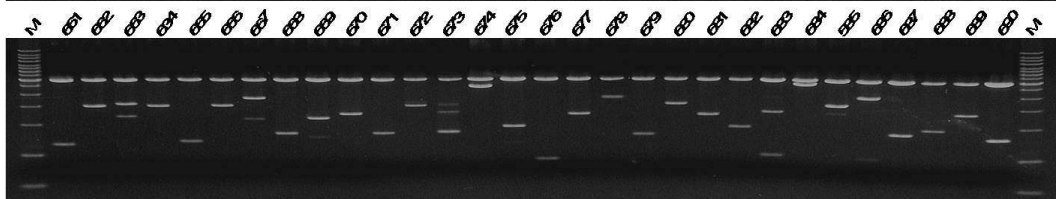
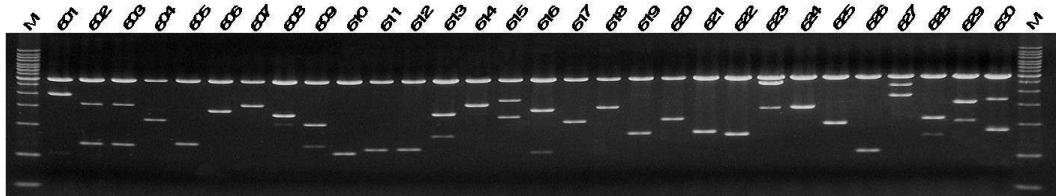
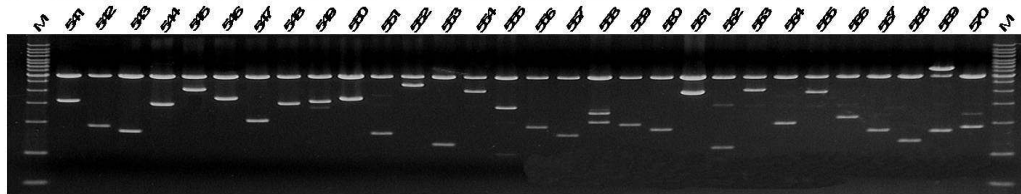
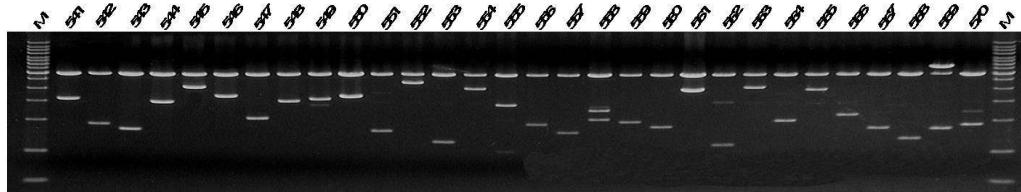
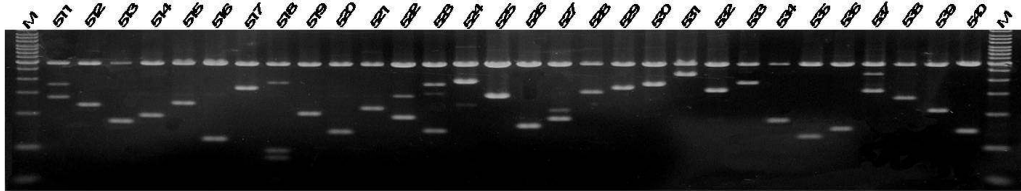
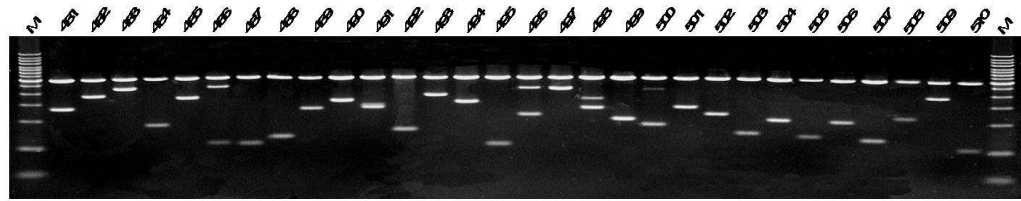
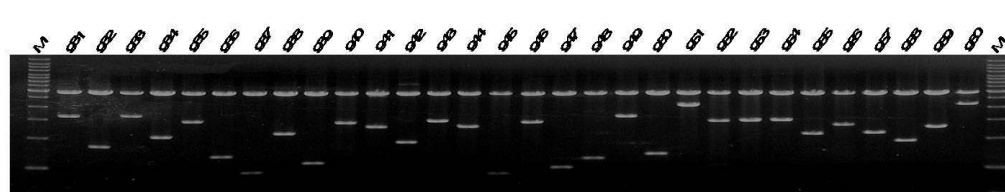
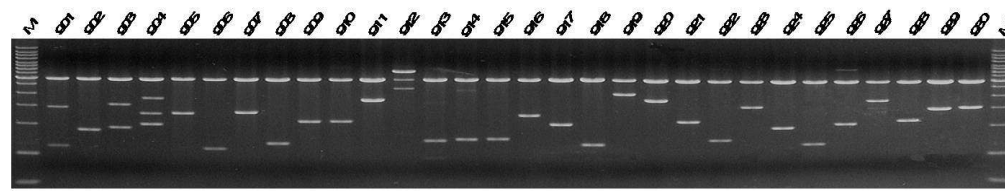
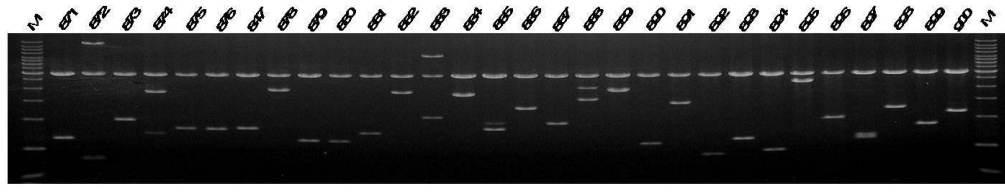
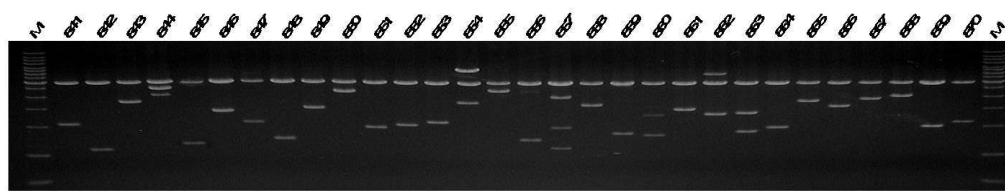
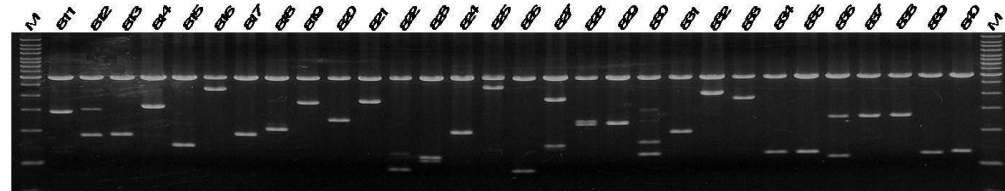
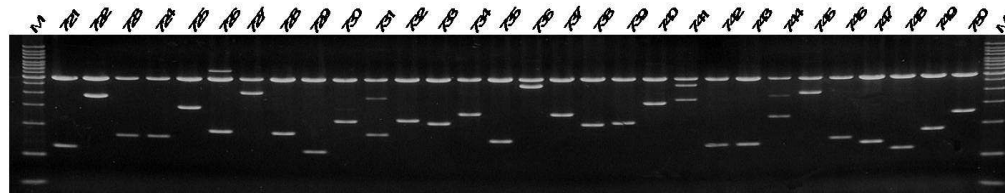
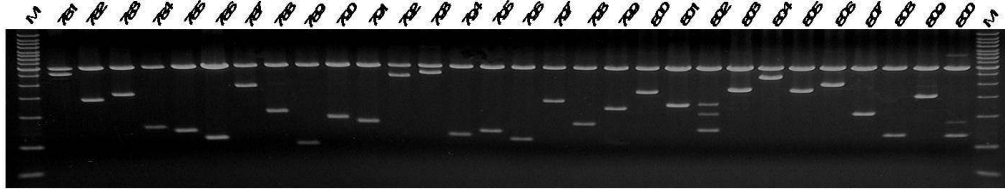
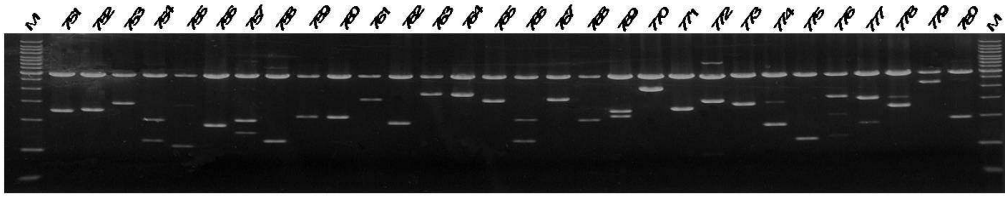


Figure 2-12. Size check of insert DNA from clones selected in pFLCIII library 210 clones of *Brassica rapa*.





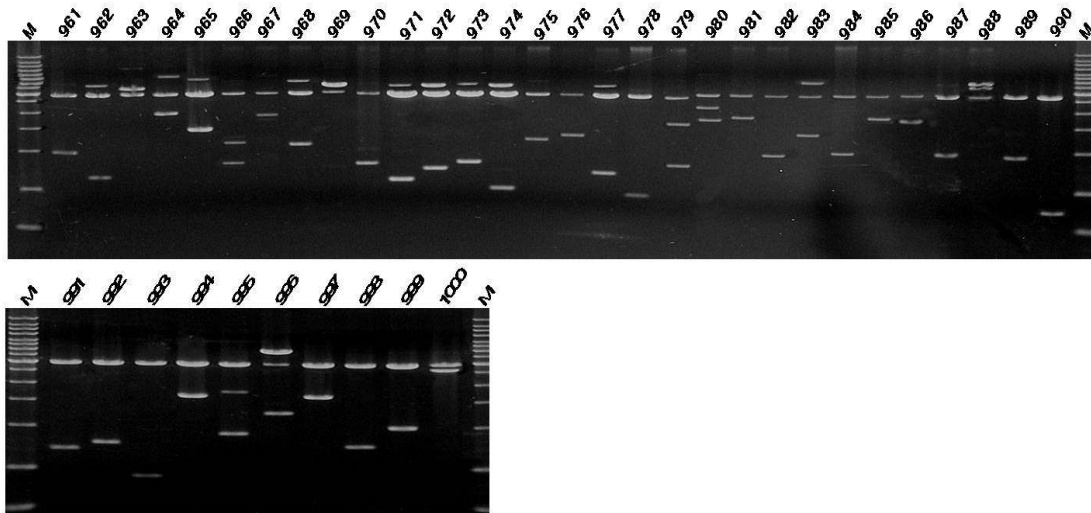


Figure 2-13. Insert cDNA from clones selected in pFLCIII library 1,000 clones of *Brassica rapa*.

3) 1,700 clone의 insert 크기 범위 및 분포도

No insert인 clone은 18 clone이었고, 500-1,000 bp에서 538 clone, 1,000-1,500 bp에서 500 clone, 1,500-2,000 bp에서 301 clone으로 전체의 78.8%였으며, 3,000 bp 이상은 35 clone 이었다(Fig. 2-14).

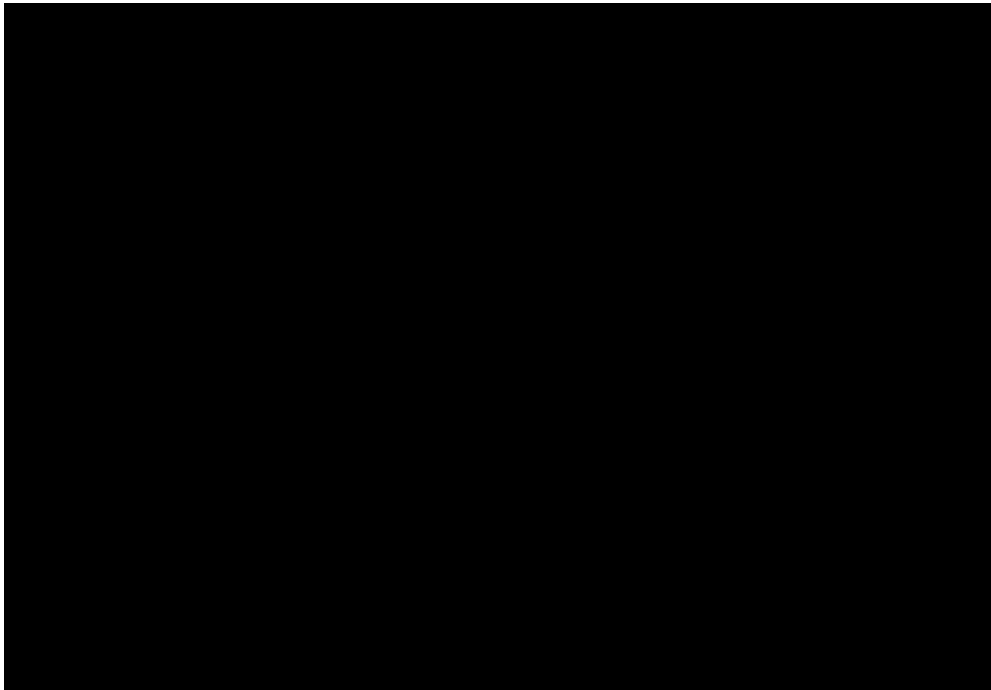


Figure 2-14. Insert size of cDNA library from clones distributed in pFLCIII library 1,700 clones.

4) 고등식물과 애기장대의 cDNA 크기 분포

고등식물 및 애기장대와 cDNA 크기를 비교한 결과 500 - 2,500 bp 사이에서 90%였고 우리의 cDNA library는 78.8%로 유사하게 분포하였다(Fig. 2-15).

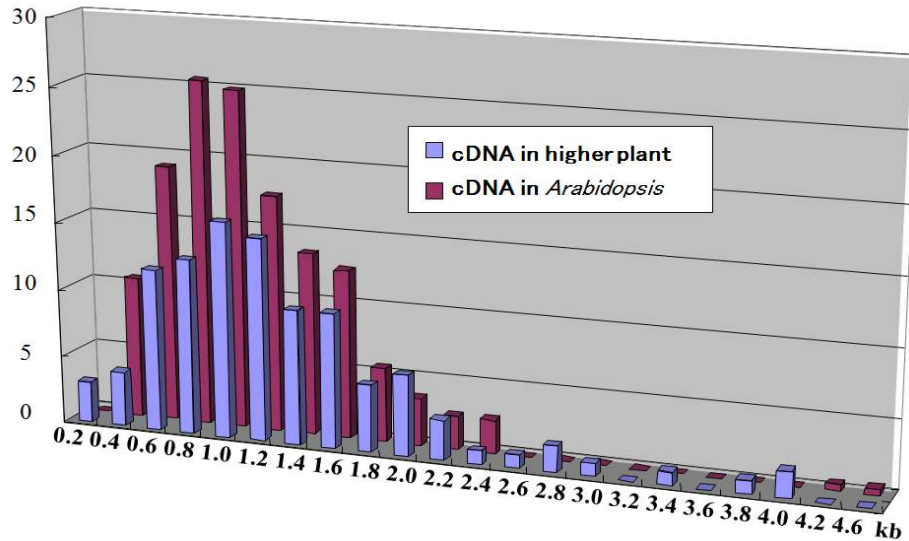


Figure 2-15. cDNA higher distributed of cDNA in higher plant and cDNA in *Arabidopsis*.

5) 980 clone의 완전장 cDNA를 염기서열 분석 결과

cDNA library의 품질을 평가하기 위하여 농촌진흥청 농업생명공학연구원을 통해 염기서열을 분석한 결과 작제된 'Osome' library는 농생공원의 지부계보다 완전장율이 높았으며 (90%), noble 유전자가 23.9%로 cDNA library의 품질이 우수하였다(Table 2-13).

Table 2-13. Blastn result analysis compared sequences of *Arabidopsis thaliana* cds and *B. rapa unigene*

| | FLC-library | EST-library |
|--|-------------|-------------|
| Full-length ratio(blast to <i>A. tha</i>) | 90.0 % | 76.0 % |
| % Identity to <i>A. tha</i> | 87.25 % | 87.57 % |
| % Identity to <i>B. rapa unigene</i> | 95.02 % | 96.7 % |
| New sequence to <i>A. tha</i> | 19.0 % | 18.2 % |
| New sequence to <i>B. rapa unigene</i> | 23.9 % | 15.5 % |

6) 1,700 clone의 완전장 cDNA를 염기서열 분석 및 유용 유전자 등록

cDNA library로 부터 1,700 clone 염기서열을 분석 후 유용유전자를 GenBank에 148

clone을 등록하였다(Table 2-14). 등록된 유용유전자의 특성을 분석한 결과 스트레스 관련 유전자 50 clone, 병 저항성 관련 유전자 13 clone 등이 있었다(Fig. 2-16). 50개의 stress 관련 유전자 분석 및 Genbank registration number(Fig. 2-17).

Table 2-14. Complete cDNA appropriated of a registration in Genbank.

| Acc. No. | Identity (%) | Description | Size (bp) | Genbank No. |
|----------|--------------|---|-----------|-------------|
| 1 | 88 | <i>Thellungiella halophila</i> light regulated protein-like protein mRNA | 414 | EU186339 |
| 2 | 84 | <i>Arabidopsis thaliana</i> HSF4 (HEAT SHOCK FACTOR 4); DNA binding/transcription factor (HSF4) mRNA | 858 | EU186351 |
| 3 | 90 | <i>Arabidopsis thaliana</i> universal stress protein (USP) family protein/ early nodulin ENOD18 family protein | 477 | EU186353 |
| 4 | 83 | auxin-responsive family protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 339 | EU186337 |
| 5 | 59 | lipoic acid synthase-like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>], <i>Zea mays</i> clone 13340 mRNA sequence | 465 | EU186340 |
| 6 | 78 | ABA-inducible protein-like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>], <i>B.oleracea</i> mRNA for pollen coat protein | 201 | EU186321 |
| 7 | 88 | <i>Thellungiella halophila</i> aluminum-induced protein-like protein mRNA | 810 | EU186341 |
| 8 | 89 | <i>Arabidopsis thaliana</i> heat shock protein 81-2 (At5g56030) mRNA | 1,833 | EU186354 |
| 9 | 94 | SKS5 (SKU5 Similar 5); copper ion binding / oxidoreductase [<i>Arabidopsis thaliana</i>], <i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i> clone KBrB036G18, | 159 | EU186355 |
| 10 | 88 | <i>Arabidopsis thaliana</i> AXR1 (AUXIN RESISTANT 1); small protein activating enzyme (AXR1) | 1,566 | EU186356 |
| 11 | 99 | <i>Brassica napus</i> bali mRNA for aluminum-induced, | 714 | EU186342 |
| 12 | 87 | <i>Raphanus sativus</i> superoxide dismutase (sod) | 636 | EU186343 |
| 13 | 81 | <i>Arabidopsis thaliana</i> DNA binding protein GT-1 (AT1G13450) | 1,197 | EU186357 |
| 14 | 65 | light-regulated chloroplast-localized protein [<i>Solanum tuberosum</i>], <i>Arabidopsis thaliana</i> PSB29 (THYLAKOID FORMATION1) (PSB29) | 819 | EU186358 |
| 15 | 90 | <i>Arabidopsis thaliana</i> UVR8 (UVB-RESISTANCE 8) (UVR8) | 1,356 | EU186359 |

| | | | | |
|----|-----|---|-------|----------|
| 16 | 85 | <i>Arabidopsis thaliana</i> universal stress protein (USP) family protein | 576 | EU186360 |
| 17 | 90 | <i>Arabidopsis thaliana</i> transcriptional repressor | 1,800 | EU186361 |
| 18 | 72 | Stress-induced protein KIN2 (Cold-induced protein COR6.6) (P31169), Rapeseed Kin1 protein (kin1) | 195 | EU186323 |
| 19 | 90 | <i>Arabidopsis thaliana</i> universal stress protein (USP) family protein | 645 | EU186325 |
| 20 | 77 | ERD15 (EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15) protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>], <i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i> clone KBrH009I04, | 471 | EU186362 |
| 21 | 81 | ERD4 (EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 4) [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 2,034 | EU186363 |
| 22 | 88 | <i>Arabidopsis thaliana</i> universal stress protein (USP) family protein | 486 | EU186344 |
| 23 | 97 | <i>Brassica napus</i> temperature-induced lipocalin (TIL) | 561 | EU186364 |
| 24 | 78 | wound-responsive protein-related [<i>Arabidopsis thaliana</i>], <i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i> clone KBrB021P17 | 267 | EU186345 |
| 25 | 89 | <i>Arabidopsis thaliana</i> ARG1 (ALTERED RESPONSE TO GRAVITY 1) (ARG1) | 960 | EU186365 |
| 26 | 100 | <i>Arabidopsis thaliana</i> COR413-PM1 (cold regulated 413 plasma membrane 1) (COR413-PM1) | 591 | EU186366 |
| 27 | 84 | <i>Arabidopsis thaliana</i> SKS11 (SKU5 Similar 11); copper ion binding / oxidoreductase (SKS11) | 1,659 | EU186330 |
| 28 | 87 | <i>Arabidopsis thaliana</i> peroxisomal small heat shock protein Acd31.2 mRNA, | 873 | EU186346 |
| 29 | 78 | universal stress protein (USP) family protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 660 | EU186367 |
| 30 | 83 | SKS12 (SKU5 Similar 12); copper ion binding / oxidoreductase [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 687 | EU186331 |
| 31 | 84 | <i>Arabidopsis thaliana</i> STO (SALT TOLERANCE); transcription factor/ zinc ion binding (STO) | 729 | EU186368 |
| 32 | 88 | <i>Arabidopsis thaliana</i> catalytic/ coenzyme binding (AT3G18890) | 1,872 | EU186347 |
| 33 | 89 | UVB-resistance protein UVR8 [<i>Arabidopsis thaliana</i>], <i>Arabidopsis thaliana</i> regulator of chromosome condensation (RCC1) family protein | 1,611 | EU186369 |

| | | | | |
|----|----|---|-------|----------|
| 34 | 87 | <i>Arabidopsis thaliana</i> AT-HSP17.6A (<i>Arabidopsis thaliana</i> heat shock protein 17.6A) (AT-HSP17.6A) | 462 | EU186348 |
| 35 | 84 | <i>Arabidopsis thaliana</i> auxin-responsive protein, putative (AT1G29450) | 411 | EU186352 |
| 36 | 85 | <i>Arabidopsis thaliana</i> cation efflux family protein / metal tolerance protein, putative | 831 | EU186334 |
| 37 | 88 | <i>Arabidopsis thaliana</i> dehydration-responsive family protein (AT2G45750) | 1,896 | EU153262 |
| 38 | 86 | <i>Arabidopsis thaliana</i> dehydration-responsive protein-related | 1,986 | EU186370 |
| 39 | 69 | avirulence-responsive protein-related / avirulence induced gene (AIG) protein-related [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 510 | EU186349 |
| 40 | 90 | <i>Arabidopsis thaliana</i> dehydration-responsive protein-related | 1824 | EU186373 |
| 41 | 82 | SEP1 (STRESS ENHANCED PROTEIN 1) [<i>Arabidopsis thaliana</i>], <i>Brassica rapa</i> subsp. | 438 | EU186350 |
| 42 | 91 | <i>Arabidopsis thaliana</i> mRNA for auxin-induced protein, complete cds, clone: RAFL16-78-F23 | 693 | EU186374 |
| 43 | 83 | <i>Arabidopsis thaliana</i> OHP2 (ONE-HELIX PROTEIN 2) (OHP2) | 510 | EU186375 |
| 44 | 84 | <i>Arabidopsis thaliana</i> auxin-responsive family protein (AT1G29490) | 417 | EU186376 |
| 45 | 84 | <i>Arabidopsis thaliana</i> DNA binding / zinc ion binding | 504 | EU186377 |
| 46 | 90 | <i>Arabidopsis thaliana</i> ERD5 (EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 5, PROLINE OXIDASE) | 1,494 | EU186335 |
| 47 | 94 | <i>Arabidopsis thaliana</i> AT-E1 ALPHA (pyruvate dehydrogenase complex E1 alpha subunit); pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) (AT-E1 ALPHA) | 1,167 | EU186336 |
| 48 | 89 | <i>Arabidopsis thaliana</i> clone pENTR221-At5g04910 hypothetical protein | 588 | EU186378 |
| 49 | 81 | ERD4 (EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 4) [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (NP_564354.1) | 2,169 | EU186338 |
| 50 | 63 | ERD12 protein (EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 12), <i>Arabidopsis thaliana</i> AOC4 | 792 | EU186379 |
| 51 | 82 | CCoAMT; caffeoyl-CoA O-methyltransferase [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 519 | EF015489 |

| | | | | |
|----|-----|---|-----|----------|
| 52 | 78 | electron carrier/ electron transporter [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 508 | EF056544 |
| 53 | 82 | protein binding / ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding[<i>Arabidopsis thalian</i>] | 588 | EF056545 |
| 54 | 93 | neoxanthin cleavage enzyme-like protein [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 639 | EF079950 |
| 55 | 71 | ATPP2-A3; GTP binding [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 687 | EF079951 |
| 56 | 72 | N A D H - u b i q u i n o n e oxidoreductase-related-like protein[<i>Oryza sativa</i>](japonica cultivar-group) | 442 | EF079952 |
| 57 | 92 | cysteine proteinase inhibitor | 652 | EF079953 |
| 58 | 85 | unknown signal peptide selection derived [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 753 | EF079954 |
| 59 | 85 | probable elongation factor 1-beta [imported] -[<i>Arabidopsis thalian</i>] | 693 | EF079955 |
| 60 | 100 | ubiquitin conjugating enzyme [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 459 | EF079956 |
| 61 | 84 | chloroplast chaperonin 10 [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 420 | EF079957 |
| 62 | 89 | oleosin-like protein [<i>Brassica napus</i>] | 360 | EF079958 |
| 63 | 100 | Actin-depolymerizing factor like At1g01750 (ADF-like)[<i>Arabidopsis thalian</i>] | 123 | EF079959 |
| 64 | 42 | DNA binding [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 558 | EF079960 |
| 65 | 95 | peptidyl-prolyl cis-trans isomerase [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 444 | EF079961 |
| 66 | 88 | cytochrome-c oxidase [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 192 | EF110926 |
| 67 | 87 | unknown protein [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 492 | EF110927 |
| 68 | 80 | serine-rich protein [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 582 | EF110928 |
| 69 | 93 | sts14 [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 381 | EF110929 |
| 70 | 100 | ribulose biphosphate carboxylase [<i>Brassica napus</i>] | 489 | EF110930 |
| 71 | 72 | unknown protein [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 618 | EF110931 |
| 72 | 76 | lamin [<i>Brassica oleracea</i>] | 513 | EF110932 |
| 73 | 72 | unknown protein [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 681 | EF110933 |
| 74 | 69 | metal ion binding [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 420 | EF110934 |
| 75 | 100 | r-protein BnS15a [<i>Brassica napus</i>] | 393 | EF110935 |
| 76 | 94 | 30S ribosomal protein S10-like [<i>Brassica napus</i>] | 582 | EF110936 |
| 77 | 94 | Kunitz-type cysteine protease inhibitor [<i>Brassica oleracea var.botrytis</i>], MYB, Drought | 672 | EF110970 |
| 78 | 94 | R2R3-MYB transcription factor[<i>Arabidopsis thalian</i>] | 801 | EF110971 |
| 79 | 88 | unknown protein [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 330 | EF110937 |

| | | | | |
|-----|----|---|-----|----------|
| 80 | 86 | A putative subunit of TRAPP from heavy metal tolerant plant | 408 | EF110938 |
| 81 | 80 | auxin-induced protein-like [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 300 | EF110939 |
| 82 | 89 | unknown protein [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 345 | EF110940 |
| 83 | 94 | PIP2;6/PIP2E; water channel [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 828 | EF110941 |
| 84 | 73 | F15H18.16 [<i>Arabidopsis thalian</i>], MYB-related | 963 | EF110973 |
| 85 | 96 | ribosomal protein S27 [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 255 | EF110942 |
| 86 | 68 | ATTIM17-2; protein translocase/ protein transporter [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 663 | EF110943 |
| 87 | 89 | putative c-myc binding protein [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 372 | EF110944 |
| 88 | 72 | putative chloroplast protein CP12 [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 393 | EF110945 |
| 89 | 91 | component of 6.1 kDa polypeptide of photosystem II reaction center [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 402 | EF110946 |
| 90 | 71 | protein binding / ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding | 600 | EF056546 |
| 91 | 90 | hypothetical protein [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 480 | EF110947 |
| 92 | 98 | cold induced protein (BnC24B) [<i>Brassica napus</i>] | 621 | EF110948 |
| 93 | 76 | copper ion binding / electron transporter [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 612 | EF110949 |
| 94 | 89 | bis(5'-nucleosyl)-tetrphosphatase (asymmetrical) [<i>Arabidopsis thalian</i>]. | 687 | EF110950 |
| 95 | 68 | unknown protein [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 474 | EF110951 |
| 96 | 83 | CHL-CPN10 [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 420 | EF110952 |
| 97 | 91 | unnamed protein product [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 549 | EF110953 |
| 98 | 79 | nucleic acid binding [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 369 | EF110954 |
| 99 | 76 | HAP5B; DNA binding / transcription factor [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 555 | EF110955 |
| 100 | 94 | MYB-like protein [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 798 | EF110972 |
| 101 | 84 | hydrogen-transporting ATP synthase, rotational mechanism [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 735 | EF110957 |
| 102 | 91 | At5g03220 [<i>Arabidopsis thalian</i>] putative protein [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 501 | EF110958 |
| 103 | 96 | Photosystem II 10 kDa polypeptide, chloroplast precursor | 249 | EF110959 |
| 104 | 84 | Zinc finger A20 and AN1 domains-containing protein | 528 | EF110960 |
| 105 | 94 | poly(A)-binding protein II-like [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 663 | EF110961 |

| | | | | |
|-----|-----|--|-------|----------|
| 106 | 83 | unknown protein [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 222 | EF110962 |
| 107 | 96 | Ribosomal protein L7Ae-like [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 387 | EF110963 |
| 108 | 99 | photosystem II 10kDa polypeptide [Brassica rapa subsp. pekinensis] | 420 | EF110964 |
| 109 | 88 | unknown protein [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 414 | EF110965 |
| 110 | 98 | chloroplast ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit precursor [Brassica napus] | 546 | EF110966 |
| 111 | 90 | hydrogen-transporting ATP synthase, rotational mechanism [<i>Arabidopsis thalian</i>](P_199514.1) | 612 | EF110967 |
| 112 | 100 | ADP-ribosylation factor-like protein [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 546 | EF110968 |
| 113 | 95 | nuclear transport factor 2, putative [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 372 | EF110969 |
| 114 | 95 | ATPase, coupled to transmembrane movement of substances [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 2,177 | DQ296183 |
| 115 | 95 | ATPGP1 (ARABIDOPSIS THALIANA P GLYCOPROTEIN1); calmodulin binding [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 4,222 | DQ296184 |
| 116 | 83 | ATPase, coupled to transmembrane movement of substances [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 2,472 | DQ296185 |
| 117 | 71 | putative cysteine proteinase inhibitor B (cystatin B) [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 619 | DQ296186 |
| 118 | 95 | CLA1 (CLOROPLASTOS ALTERADOS 1) [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 2,531 | DQ452297 |
| 119 | 86 | unknown protein [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 483 | DQ405263 |
| 120 | 86 | peroxisomal targeting signal type 2 receptor (PEX7) [<i>Arabidopsis thalian</i>] | 1,249 | DQ405265 |
| 121 | 94 | calmodulin binding protein IQ | 1687 | AB300321 |
| 122 | 86 | dihydrodipicolinate reductase | 1,430 | AB300320 |
| 123 | 96 | putative 15kDa selenoprotein | 684 | AB300319 |
| 124 | 92 | dissociation inhibitor | 1,622 | AB300318 |
| 125 | 89 | cinnamate-4-hydroxylase | 1,813 | AB300317 |
| 126 | 83 | putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase | 1,148 | AB300316 |
| 127 | 79 | auxin-responsive protein IAA | 1,023 | AB300315 |
| 128 | 96 | glycerophosphodiester phosphodiesterase | 1,337 | AB300314 |
| 129 | 94 | AP2/EREBP transcription factor | 1,583 | AB300313 |
| 130 | 88 | putative lactoylglutathione lyase | 1,152 | AB300312 |
| 131 | 86 | ornithine-oxo-acid transaminase | 1,735 | AB300311 |
| 132 | 95 | oxygen-evolving enhancer protein 3-2 | 1,038 | AB300310 |

| | | | | |
|-----|----|--|-------|----------|
| 133 | 92 | 2 C - m e t h y l - D - e r y t h r i t o l 2,4-cyclodiphosphate | 810 | AB300309 |
| 134 | 84 | ATPK1 (P70 Ribosomal S6 kinase): kinase/protein binding (ATPK1) <i>Arabidopsis thaliana</i> | 1,377 | EU708610 |
| 135 | 85 | disease resistance response protein-related / dirigent protein-related, smimilar to dirigent protein (<i>Thuja plicata</i>); similar to pathogenesis-related protein (<i>Pisum sativum</i>) | 567 | EU186317 |
| 136 | 89 | disease resistance-responsive family protein / dirigent family protein, similar to disease resistance response protein 206-d (<i>Pisum sativum</i>); similar to dirigent protein (<i>Forsythia x intermedia</i>) | 564 | EU186318 |
| 137 | 92 | Encodes a defensin-like (DEFL) family protein. | 273 | EU186319 |
| 138 | 87 | thaumatin-like protein, putative / pathogenesis-related protein, Thaumatin-like protein precursor { <i>Arabidopsis thaliana</i> }, pathogenesis-related group 5 protein (<i>Brassica rapa</i>) | 738 | EU186322 |
| 139 | 90 | chitinase, putative, similar to basic endochitinase CHB4 precursor (<i>Brassica napus</i>) | 807 | EU186324 |
| 140 | 90 | chitinase-like protein 1 (CTL1), similar to class I chitinase (<i>Halimolobos perplexa</i> var. <i>perplexa</i>) | 966 | EU186371 |
| 141 | 89 | chitinase-like protein 1 (CTL1), similar to class I chitinase (<i>Halimolobos perplexa</i> var. <i>perplexa</i>) | 774 | EU186372 |
| 142 | 89 | Bet v I allergen family protein, similar to major pollen allergen Bet v 1 (<i>Betula pendula</i>); Pathogenesis-related protein Bet v I family | 468 | EU186326 |
| 143 | 86 | pathogenesis-related thaumatin family protein, similar to receptor serine/threonine kinase PR5K (<i>Arabidopsis thaliana</i>) | 966 | EU186327 |
| 144 | 85 | longevity-assurance (LAG1) family protein, similar to Alternaria stem canker resistance protein (ASC1) (<i>Lycopersicon esculentum</i>); Longevity-assurance protein (LAG1) | 915 | EU186328 |
| 145 | 95 | similar to thaumatin, putative [<i>Arabidopsis thaliana</i>]; similar to putative thaumatin-like protein [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)] | 966 | EU186329 |

| | | | | |
|-----|----|---|-------|----------|
| 146 | 85 | longevity-assurance (LAG1) family protein, similar to Alternaria stem canker resistance protein (ASC1) (<i>Lycopersicon esculentum</i>); Longevity-assurance protein (LAG1) | 756 | EU186332 |
| 147 | 87 | U-box domain-containing protein, contains similarity to immediate-early fungal elicitor protein CMPG1 (<i>Petroselinum crispum</i>) | 1,254 | EU186333 |
| 148 | 98 | pollen coat protein mRNA, complete cds. | 579 | EU186320 |

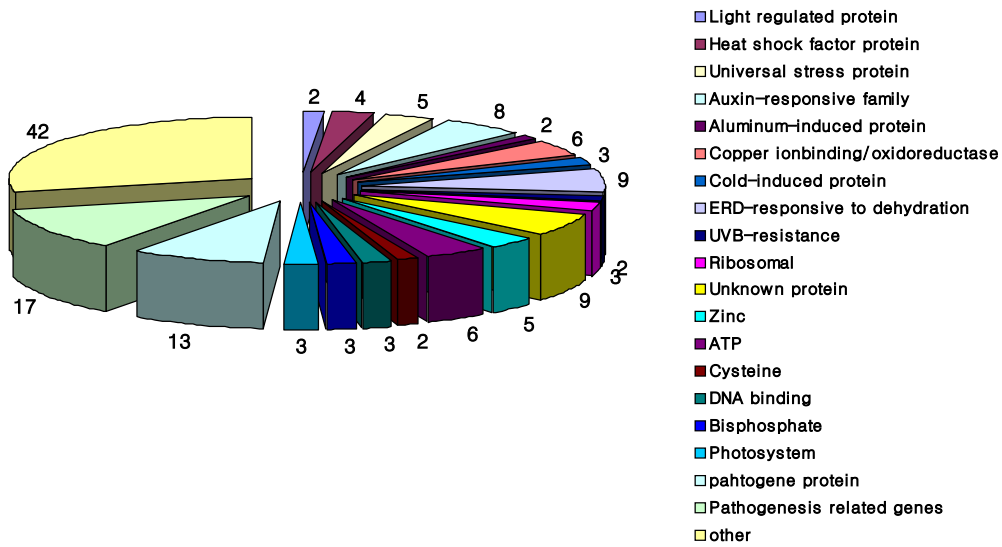


Figure 2-16. Characteristic of 148 genes distributed of a registration in Genbank.

>S-1(Leaf) EU186339

GGCCAAATCGGCCATCACGACAACCAATATOCAAAATCACTAACTAATCTTCTTACACAAAAAATGCAGGGAGCTTTGTGCAT
CAAACCAACCATTTCTOCACCTTTCTTCTCOAAAGCTCAGCTCTTCTTCTOCTCAGACCATCTCCACCAACCAACCOCTCAAGACTC
TCTTCTCTCAGATTCAGACCAACTCATCATCTOCTTCAOCTCTGATOCACCTCAOOGTAGACTACAAGACTCTOCCOCTCTCTG
TTTTOOCAGCTGAAGCATGTGAAGTAATCAGOGGTTAOGCOCTGTTCTGCTGACATTTAOCCTGAAGTCAAGCTTGAAACAAAGOC
CGTCTCAOCTOCCGTGGCTTCAGAGCOCTGTTGAOOGAGAATAOCTAGAGTATAACAACAAAAACAGITTTTCCOCCGTGAGGCT
TGTGATGATCTTGGAGGAGAGTTCTGTGAAOCTGACTATCAAAAAGATGTTTACTAGAAAAGGTTTTATCTGATGTGAATATGTG
TTTGTGTATCTCTGTAOCCACTCATTAAATGTATGAAGTCTAGCTTCACTTTTAAATCAAAAAAAAAAAAAAAAAACATGGGCCATAA
GGGCC

atgcagggagccttgtgcatcaaaccaaccattctccactttcttctccaaagctcact 60
M Q G A L C I K P T I L P L S S P K L T
cttctcctcctcagaccatctccaccaccaaacctcaagactcttctctcagattc 120
L L P P Q T I S T T K P S R L S S L R F
agacaaactcatcatctccttcaacctctgatccactcaccgtagactacaacgactct 180
R P N S S S P S T S D P L T V D Y N D S
cccctctctgtttccagctgaagcatgtgaagtaacagcggttacgcctgttctgct 240
P L S V F P A E A C E V I S G Y A C S A
gacattaccctgaagtcaagcttgaacaaagcccgtctcacctcccgtggctcagag 300

D I Y P E V K L E T K P V S P P V A S E
cctggtgaccgagaatacctagagtataacaacccccaaacagttttccccgctgaggct 360
P V D R E Y L E Y N N P K T V F P A E A
tgtgatgatcttgaggagagtctgtgaacctgactatcaaaaagatgtttac 414
C D D L G G E F C E P D Y Q K D V Y

>S-2 (Flower) EU186351

GGCCAAATCGGCCATCAOCCGCACTTAAAAACAGTTTTGTTTGCTAAAACTTTAGAAAAAATATAACACTTCTAACTTTGGTTT
AGTTTTGTATTATTTCTCAOCCGTTTAGCTCOCCGGAAGTATGGTCGTAGTCTCOCAACTTCTOCTOCTOCATCAGATAATCOGTTAG
ATGGAAGAAACAAAGAACTCOGATCTOCTOCCGCTCTOCTGTCTTCTOCTCTCAGGCTTCTATTGCTGGGACTGGGAATTTCTCA
CTGCTCTCTTGTCTTTAGTTGCTGAATCTTCTOCCGATTTTTCATTTTCTAAAAATCTTATTTTCTCTOCTTCTGTCTAGAT
TATTTTATGTGCATCTTTATTATTTTCTTATGTTTTTAAAAATTOGCOGGTGTATGATGGOGGOGCAAAGGTCTGTTCOGGOGC
CGTTTTTAAGCAAAACGTACCAGCTAGTGGATGATCAGAGCACAGAOCGTOGTTTCATGGAOAGAAGATGGAACAGCTTTTGT
CGTTTGGAAAACAGCTGAGITTOGCTAAAGATCTTCTOCCOCTAGTACTTCAAGCATAACAACCTTCTCAAGCTTCAATTOGTCAGCTC
AACACTTACGGTTTTCCGGAAAACGTGTACCCGACAAGTGGGAGTTTTGCTAACGACAACCTTCCGGAGAGGACAAGAGGAACCTGCTGT
CCGAGATACGGCCGGCCGAAGCCGGTGTATGCOCCGGCCGGGAAATGCGTAGTGTGTTGGTTGCOGTCGGAGTCAAACCTCCGGCCGG
TGACGATCAOCCGTTCTAGCTCCOAGTCATCAOCCGGTGAAGCAOCCGGATCGGTGGAGAATATGGTTGCTGATCTGTCCGGA
GAGAOCGAGAAGCTGAAAAGAGAGAACAGCAGTTTTGAGCTCCGAGCTCCGGCCGGGAAGAGGCAGCGTGAOCAGCTCGTGGGT
TCTTGACCCGAGCAGATGAAAGTAGGACCCGAGCAGATOGATCAGATGATCAAAGGAGGAGGGAAGAACTCAAACCCGGCCGGTGA
GGAGGAGAGAGCCACTGCCAAGGCTCCGGCCGAGACAACGGTGGAGCCGCCGTGGAGGGAGAGAAGCCGGTGGCAGGTGAAGGG
TTGAAACTGTTTGGGGTGTGGGTGAAAGGAGAGAGAAAAGAGAGGGCCGGGATGAGAAGAATTTGGTGGTGGTGGTCCOCATA
TGACGGAGATAAAGAAOCTGGACTTTCAOCCOCCGTTGTGGAAGAGCAGCAAAGTCTGCAACTGATAAAGACTTCTAGATACTTG
TTCAAACAAOCTGTGACACGTCATTGAOAGAAGAGAAGAAAAAGGGAAAGCTGAAGTTTTAATGATTTTTAATAATTTCCGTA
AGGGAGATTAGTGCCTTATTTTTATGTTAAAATTTGGATTTTCATGATTATATACTTTATTAGTGTATTAAGTTTGAAAAAAAT
AAGACAAACGTTTTCCGATTTTTACTAAAAAATAAATAAATACCGGGCCATAAAGGGCC
atgatggcggcgcaaaaggtctgttccggcgccgttttaagcaaaacgtaccagctagtg 60
M M A A Q R S V P A P F L S K T Y Q L V
gatgatcagagcacagacgacgtcgtttcatggaacgaagatggaacagcttttgcgtt 120
D D Q S T D D V V S W N E D G T A F V V
tggaaaacagctgagttcgctaaagatcttctccctcagtacttcaagcataaacaacttc 180
W K T A E F A K D L L P Q Y F K H N N F
tcaagcttcattcgtcagctcaacacttacggtttccggaaaactgtaccgggacaagtgg 240
S S F I R Q L N T Y G F R K T V P D K W
gagtttgctaacgacaacttccggagaggacaagaggaactgctgtcggagatacggcgg 300
E F A N D N F R R G Q E E L L S E I R R
cgcaaggcgggtgatcgccgcgccgggaaatgcgtagtcggttgggtcggcgtcggagtc 360
R K A V I A A A G K C V V V G S P S E S
aactcggcgggtgacgatcacggttctagctccacgtcatcaccgggtcgaagcaccct 420
N S A G D D H G S S S T S S P G S K H P
ggatcgggtggagaatatggttgcgtgatctgtccggagagaacgagaagctgaaaagagag 480
G S V E N M V A D L S G E N E K L K R E
aacagcagtttgagctcggagctcgccggcggcgaagagcagcgtgacgagctcgtggcg 540
N S S L S S E L A A A K R Q R D E L V A
ttcttgaccgagcagatgaaagtaggaccggagcagatcgatcagatgatcaaggagga 600
F L T E Q M K V G P E Q I D Q M I K G G

gggaagaaactcaaaccggcggtggaggaggaagagagcgactgcaaggctgcggcgga 660
 G K K L K P A V E E E E S D C E G C G G
 gacaacggtggagccgccgtggaggggagagaagggggtggcaggtgaagggtgaaactg 720
 D N G G A A V E G E K G V A G E G L K L
 tttggggtgtgggtgaaaggagagagaaagaagaggggcccgggatgagaagaatttcgtg 780
 F G V W V K G E R K K R G R D E K N F V
 gtgggtgggtcccatatgacggagataaagaacgtggactttcacgcgccgttggtggaag 840
 V G G S H M T E I K N V D F H A P L W K
 agcagcaaagtctgcaac 858
 S S K V C N

>S-3(Stem) EU186351

GGCCAAATGGGCCATCACGACTTAGAAATCATCGAGAAAGAGAAAGAAATAGTAATAGAAATGTTAAAGCAOGTAOCG
 GTGGGTGTGGGAATGGACTACTCTOCAAOCGAGCAGATGGCTCTTCGGTGGACGGGGGAGAATCTOCTTGAOGATGGAGACCA
 TCATTTTGATTCATGTTCAACCCCAAAAACGCTGAGCACACCCCGAAAATCCTCTTTGAGGAAAACGGTTCAOCTTTGATTCOOCT
 GGAAGAATTTAGAGAGGTTAATTTCTCTAACAGTATGGACTTGCCTATGATCOGGAGGTTCTTAATGTTCTTGATACTCTCTCT
 AGGGCAAAGAAGGTGAAGGTGGTGGCAAAGTGTATTGGGGAGATCCAAGGGAGAAACTTTGCGATGCOOGTCAAATCTAAAAC
 TOGATTTCTATTGTTCTTGGCAGTCGAGGCTTGGGTCTCTCAAAGGATGTTGCTGGGAAGTGTGAGCAATCATGTGGTGACAAA
 TGCAACATGTCCAGTCAOAGTGTAAAGCOCAATTAAAGTAGATTGTTTTAAAAAATTTGGAGTATAOCTTTGACTTGTATGTT
 GTATTCATACATTAGTCTTTCAATAAACTAAAGTAAAATGTTATCAGTTATCACTTTTGTGTATGTAAAAAACACATGAAAA
 ACAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGAGGCCATAAGGCC

atggttaaagcacgtacgggtgggtgtgggaatggactactctccaacgagcagatcggct 60
 M V K A R T V G V G M D Y S P T S R S A
 cttcgggtggacggcgagaaatctccttgacgatggagacaccatcattttgattcatgtt 120
 L R W T A E N L L D D G D T I I L I H V
 caaccccaaaacgctgagcacaccgcgcaaaatcctctttgaggaaaccggttcaccttg 180
 Q P Q N A E H T R K I L F E E T G S P L
 attccctggaagaatttagagaggtaatttctctaaacagtatggacttgcttatgat 240
 I P L E E F R E V N F S K Q Y G L A Y D
 ccggagggttctaattgttcttgatactctctctagggcaagaagggtgaagggtgggca 300
 P E V L N V L D T L S R A K K V K V V A
 aaagtgtattggggagatccaagggagaaactttgcatgcccgtcgaaaatctaaaactc 360
 K V Y W G D P R E K L C D A V E N L K L
 gattctattgttcttggcagtcgaggccttgggtcctctcaaaaggatgttgctgggaagt 420
 D S I V L G S R G L G P L K R M L L G S
 gtgagcaatcatgtggtgacaaatgcaacatgtccagtcacgggtgtaagccaat 477
 V S N H V V T N A T C P V T V V K A N

>S-9(Leaf) EU186337

GGCCAAATGGGCCATCACGAACAACCTOACCAAAAGAAGAAGAAGAAGCAGAGAAAAOCCOCTGAGOCCTACTTCTACTGT
 TTGCTTTCTCTTCAAGATTTTTGAGAAATGTGCAAGAOGTTGAAGCTTTTCATTAGAAAAGGTACAACCTTGCTGCTTATTCACT
 GGATTCOCAAAGAGTGTGAAGATTGTGGTGAGTTTGAGGAAGAGGGTAAATGGGGCAACAACGGTTCCOAGTGTATTAAGAAG
 GGCATGTGGCAGTGTGCTGTAAAAGGAGAGAGAGCTGTGAGGTTTGTGTTGGAGCTTCAAGAGTTGTACAAAACCTGAGTTTAG
 GAGACTGCTTGAACCTGGCAAGAGAGGAGTTTGGGTTTCAACCTAGAGGACCTCTCACCATTOOCTGTGAGCAGAGAAGAAGTACAG
 AAGATCTACAAGAAAGTAGGAAGGGATAGTCTTTGATTTGTTATTTGTAAGGAATCAATCATTAGTTGATTTGAGATTCTTT

TCTTACAAGAATTAACCATCTTACTGTTTCTCTTATTACTGAAACATGTTATGATTAAATTTACAAATTATTACTTTATGCTGG
 TTGTAGTTCAATTTTCTTTTACTGGTTTTATAAACAGCTTGTATGGAGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAATGGGCCATAAGGGCC
atgtgcaagacggtgaagcttttcattagaaaggtacaaccttgctgcttattcactgga 60
 M C K T L K L F I R K V Q P C C L F T G
 ttctccaagagtggtgaagattgtggtgagtttgaggaagagggtaatggggcaacaacg 120
 F S K S V E D C G E F E E E G N G A T T
 gttcccagtgatgtaaagaagggcatgtggcagtgattgctgtaaaaggagagagagct 180
 V P S D V K E G H V A V I A V K G E R A
 gtgaggttggttgagactcaagagttgtacaaacctgagtttaggagactgcttga 240
 V R F V L E L Q E L Y K P E F R R L L E
 ctggcaagagaggagtttgggttcaacctagaggacctctcaccattccctgtcagcca 300
 L A R E E F G F Q P R G P L T I P C Q P
 gaagaagtacagaagatcctacaagaaagtaggaagggg 339
 E E V Q K I L Q E S R K G

>S-10.(Leaf) EU186340

GGCCAAATCGGCCATCACGAAACAGTTGTTTATTGTCACGACAGATOGATTOCCACTTTCCAAATCTTTCTTCCAACACACA
 GATTCTOCTCTCTCGGCACTCAGATATGAGTAGCCTCATCGCTTCATCOGCCAOCGGTTCTCOCTCOOGTGGGOCOCACGGCGCTC
 AAATCTTGCATCTCOCCACCTCTCGCTCOCAATCOCCGAOCCAAACGCGGAGCTCGAGAAGAGCTTCAACCATGACGGITTOGAT
 GCGAOCGTAGCTACAAAAACAGCTGATTGGTGAACGCTGAGGAGACCGAGCTGTCCGAAGAAGAAATGGAAGCGAAGGCGAAGGT
 TGGATCTTGCATCAGAGTGACTGCGCOGTTGAAGGTTTACCATGTGAACCGCTCCCGGAGGTTGATTGGAAAGGGATGGAAGGT
 AAGCTGAAAGACTAOCGTGGCOGTGTGGAAGGGGAAACGAATATCAGCTAATCTTCTTACAAGGTTGAGTTCTTTAAAGAGGTTG
 AAGGTGCTGGTCTGTTAAGTTTGTGCTCATCTCAAGGACGAAGAGTTGAGTTTCATOGATGCTTGATGATGAGACAACAAACG
 CAGATTCTTTTTCTOCTCTTGTGTTGGTGAACCTGGGAATGGAGAGAATGATTGTATGACTGAGAACACTGATGTATGTG
 TGTGTATACCTTTAGCAATCATATACATAAGCATCTCTTCGCCTTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAATGGGCCATAAGGGCC
atgagtagcctcatcgcttcatccgccaccgttctccctccgtgcgggccccacggcgctc 60
 M S S L I A S S A T V L P P C G P T A L
 aaatcttgcattctccccacctctcgctcccaatcccgaaccaaacgcgagctcgaga 120
 K S C I S P P L A S Q S R T K R A S S R
 agagcttcaacatgacggttcgatgacgtagctaccaaacagctgattcggtgaac 180
 R A S T M T V R C D V A T K T A D S V N
 gctgaggagaccgagctgtcggagaagaatggaagcgaaggcgaaggttgatctcg 240
 A E E T E L S E E E M E A K A K V G S S
 atcagagtgactgcgccgtgaaggttaccatgtgaaccgcgtcccgaggttgattg 300
 I R V T A P L K V Y H V N R V P E V D L
 gaagggatggaaggtaagctgaaagactacgtggccgtgtggaaggggaaacgaatatca 360
 E G M E G K L K D Y V A V W K G K R I S
 gctaactcttacaaggttgagttctttaaagaggtgaaggtcgtggtcctgtaag 420
 A N L P Y K V E F F K E V E G R G P V K
 ttgttgctcatctcaaggacgacgagttcaggttcatcgatgct 465
 F V A H L K D D E F E F I D A

>S-11(Flower) EU186321

GGCCAAATCGGCCATCACGACAAGTTTCCCTTGCAAATTATAATTTGTTTTTAAAGGGAGATAAGAAAATGTCTAACACACAGT

F Y S A Y L V A D K V I V T T K H N D D
gagcagtacgtgtgggagtctcaggctgggtgggtctttcactgtgaccagagacacctct 240
E Q Y V W E S Q A G G S F T V T R D T S
ggagagagtcttggtaggggtactaagatggctccttcacctcaaggaggaccagttggag 300
G E S L G R G T K M V L H L K E D Q L E
taccttgaggagaggaggcttaatgatttggcaagaagcactctgagttcatcagctac 360
Y L E E R R L N D L V K K H S E F I S Y
ccaatctccctgtggatcgagaagaccattgagaagagattagtgatgacgaagatgatg 420
P I S L W I E K T I E K R L V M T K M M
agagaagaagcgaggaaggaaagggttgagagtcgatgaggagaaagaaaaggaggagaag 480
R E E A R K E R L R V D E E K E K E E K
aaaaagaagaagattaaggaggttctcgcgagtgggacttggatgaacaagcagaagcct 540
K K K K I K E V S R E W D L V N K Q K P
atctggatgaggaagcctgaggagatcaacaaaggaggtagcgtgccttctacaagagt 600
I W M R K P E E I N K E E Y A A F Y K S
ctcagcaacgattgggaagagcatttggccgtgaagcacttctcggttgagggacagctc 660
L S N D W E E H L A V K H F S V E G Q L
gagttcaaggctgttctctttgtacccaagagagctcctttgatctatttgacaccaag 720
E F K A V L F V P K R A P F D L F D T K
aagaagcccaacaacatcaagctttacgtccgtcgtgtcttcatcatggacaactgtgag 780
K K P N N I K L Y V R R V F I M D N C E
gacatcatcccagagtaccttggctttgtcaaaggtattgtcgattctgaagatcttctc 840
D I I P E Y L G F V K G I V D S E D L P
ctcaacatctcaagagagacggtgcagcagaacaagatccttaaggatccgcaagaac 900
L N I S R E T L Q Q N K I L K V I R K N
ctcgtgaagaagtgatggagctcttctttgagattgctgagaacaaggaggactacaac 960
L V K K C M E L F F E I A E N K E D Y N
aagtctacgaagcattctctaagaattgaagctcggcatccacgaggactctcagaac 1020
K F Y E A F S K N L K L G I H E D S Q N
agaaccaagatcgctgagctgctccgttaccactcgaccaagagcggtgatgagttgacc 1080
R T K I A E L L R Y H S T K S G D E L T
agcctcaaggattacgtgacaaggatgaaggaaggtcaggaggatattcttctacatcacc 1140
S L K D Y V T R M K E G Q E D I F Y I T
ggtgagagcaaaaaggctgtggagaattctccattccttgagaggctcaagaagaaaggc 1200
G E S K K A V E N S P F L E R L K K K G
tatgaagtcctttacatggttgatgccatcgatgagatgccattggccagctcaaggaa 1260
Y E V L Y M V D A I D E Y A I G Q L K E
ttcgagggaaagaagctcgtctctgcaaccaaggaaggcttgaattggaagagtcagag 1320
F E G K K L V S A T K E G L K L E E S E
gacgagaagaagaaaaaggaggagctcaaggagaagtttgagggactctgcaaagtgatc 1380
D E K K K K E E L K E K F E G L C K V I
aaggacgtacttgagacaaggctcgagaaggttattgatccgaccgtgttgaggactcg 1440

K D V L G D K V E K V I V S D R V V D S
 ccttgctgtctggtaacaggggaatacgggctggactgctaacatggagaggatcatgaaa 1500
 P C C L V T G E Y G W T A N M E R I M K
 gcgcaggctttgagagacagcagcatgggaggttacatgtccagcaagaagacaatggag 1560
 A Q A L R D S S M G G Y M S S K K T M E
 atcaatcctgagaatgcgatcatggacgagctgaggaagagagccgaagctgacaagaat 1620
 I N P E N A I M D E L R K R A E A D K N
 gacaagtctgtgaaggatcttgttcttctcctctttgagactgctcttctcacttcaggt 1680
 D K S V K D L V L L L F E T A L L T S G
 ttcagcttagacgagcccaacaccttcggaagcagaatccacaggatggtgaagctggga 1740
 F S L D E P N T F G S R I H R M L K L G
 ttgagcattgatgatgatgatgccggtgaagccgatgcagagatgccaccgcttgaggat 1800
 L S I D D D D A V E A D A E M P P L E D
 gatgccgatgctgaaggcagcaagatggaggaggctcgac 1833
 D A D A E G S K M E E V D

>S-14(Stem) EU186355

GGCCAAATGGGCCATCACGATGTGGAATCTAAGATCAGAGITTTGGGCAAGACAGTACTTAGGACAACAGITCTATCTAOGTGTCTACACAAOGTCCACTTCTCTTAGGGATGAGTAOCCAAATOOCCAAAGAAOGCTCTTCTTTGOGGTAGAGCTAGTGGTOGTGCAOCCA
GACCCTTTGAGCGGTGGAGAGATAAGAGAGATGGTCAACAATACCAACTGATTCGTTGTGGACGAGTGTITTTCTGTITTTATTC
ATTCTTCATTTTGCTAATGAATGGAAGAGTGTGTGCAATCATTATGTACAGITTTGTAACGATCTCAGCTOGAGGTCTCAATTCT
TATCTTTCTTTTTATATAAAAAATAACTTTGGAGGGAAA
AAAAAAAACTGAGGCCATAAGGGGCC

atgagtacccaatccccaagaacgctcttctttgcggttagagctagtggctcgtcgacca 60
 M S T Q S P R T L F F A V E L V V V A P
 gaccactttgagcgggtggagagataagagagatgggtcaacaataccaactgattcgttgt 120
 D H F E R W R D K R D G Q Q Y Q L I R C
 ggacgagtgtttctgttttattcattcttcatthtgc 159
 G R V F S C F I H S S F C

>S-15(Stem) EU186356

GGCCAAATGGGCCATCACGAAGCAACAATGTGCAGAGGCTAAAAOCCAAGTAOGATOGTCAACTCAGGATATGGGGGGAGGTAGGGC
AAGCTGCTTTGGAAGAAGCGAGCATCTGTTTGCTCAATTCGOGGCOOCCACTGGCTCOGAGGOGTTGAAGAATCTOGTCTOCTGGTGG
AGTTGGGAGCATCAOOGTGTGATGGATCCAAAGTCGAGCTTGAGAGOCCTTGGAACAACCTTCATGGTGGATGAGGGGAGTGT
GGTCAATCAAAAGCOAAGTCTGTTTGTGOGITTTCTCAAGAGCTTAATGATTCGTTAAAGCTAAGITTTATTGAGGAGGATCOGG
ATAOCTTGATTATCACAAOCCCTTCTTCTCTCCTTCAOCTOGTCATOGCCACTCAGCTGGTGGAGAGTCAATGGTGAA
ACTTGATAGAATCTGTGAGAAGCAAAOCTCAAGITGGTTTTGCTOGCTCTTATGGOCCTGCTGGCTTTGTTGCTGTCTCTGTT
AAGGAGCACACCATAATTGACTCAAAGCCTGATCATTTCTTGATGACCTTGGCTTGAATAATCCATGGOCCTGAACTCAAGAGCT
TTGTGGAGACCATTGATCTAAATGTATCAGATOCCTGTAGCTCATAAGCACATAOCTTACGTOGTCTTCTTGTGAAGATGGCTGA
TGAATGGACTCAGTCCATAGTGGCAATCTTCTCTOGAACCAGGGAAGAGAAAAAGAGITTAAGGATTTGGTTAGTCCAGATGATA
TCTATGGATGAGGATAACTACAAAGAAGOCATTTGAAGCOGCTTTCAAAGITTTTGGCTOCTOGTGGAAATCAGCTCAGAGATTC AAC
AGATTAGCAGTGATACTTGTGCTGAAOOGAGITCAAATTOCTCAGATTTTGGGTGATGGTAGOGGCTCTGAAGGAGITTTGTCTT
GAAOAGGTGATGGAGAGGCAOCCCTTGAAGGCTCTATAOCAGATATGACATOGTCAACAGAGCATTACATCAATTTGCAGAAA
ATATATCTAGCGAAAGCTGAGGCTGATTTTCTTGTGATGGAGGAACGAGITTAAGATATTTTAAAGAAAATCGGTAGAGATOOGA

GCAGCATCTCAAAAACCAACATCAAGAGCTTCTGTAAGAATGCAAGAAAACCTAAAGTATGCAGATACOGTATGGTAGAGGAOGA
ATTTAGTAATCCTTCTGTAACCGAAATTCAAAAGTGTTTAGCGGATGAGGATTACAGTGGTGCAATGGGATTTTACATCCTTCTT
AGAGOOCTGGACAGATTTACTGCCAACTATAACAAGTTTCTGGCCAGITTTGATGGAGGGATGGATGAGGACATTTCTCGGTTAA
AACTACTGCOCTTGAGTCTCCTTACCGACTTGGGATGTAACGGCTCAGTACTGCOOGATGAOCTTATCAATGAGATGTGTGCTT
TGGTGOCTCTGAGCTTCATGTGGTTGCTGCOCTTTCTGGAGGAATOGGTCTCAGGAGGOCATCAAGCTTGTGACAAAAACAGITT
GTTCOGATGTTGGGGACTTACATCTTCAATGGCATTGATCACAAGTCTCAGTATTGGCATTGTAGAAGGTCTTCTTCACTTTCT
CATTGCTTGAAGCAGAGAGAAGAGCGTTCTTATATCTTTTTGAGTTTAAAAATAACTGTTCAAGGACGACTCAGCOGGCACAA
TATTGTTTAGAGATGTTCTCAAAGTTCAAAAATTTGGAAGGTTTGGTTTGCATTTGTGTGACATTGAACCAGATTGAAGAAACATA
CAAAAATAGGCGAGAGCAAAAAAATAAAAAAACTGAGGCCATAAGGGCC

atg|tcagaggctaaaaccaagtacgatcgtcaactcaggatatggggggaggtagggcaa 60

M S E A K T K Y D R Q L R I W G E V G Q
gctgctttggaagaagcgcgagcatctgtttgctcaattgcgccccactggctccgaggcg 120
A A L E E A S I C L L N C G P T G S E A
ttgaagaatctcgtcctcggagggtgggagcatcaccgtcgttgatggatccaaagtc 180
L K N L V L G G V G S I T V V D G S K V
gagcttgagaccttggaacaacttcatgggtggatgaggggagtggttgatcaatcaaaa 240
E L G D L G N N F M V D E G S V G Q S K
gccaagtctgtttgtcgtttctcaagagcttaatgattctgttaagctaagttatt 300
A K S V C A F L Q E L N D S V K A K F I
gaggaggatccggatacgttgattatcacaacccttcttctctcacttcaccctc 360
E E D P D T L I I T N P S F F S H F T L
gtcatcgccactcagctgggtggaagagtcaatgggtgaaacttgatagaatctgtcgagaa 420
V I A T Q L V E E S M V K L D R I C R E
gcaaacgtcaagttggtttttgctcgtcttatggccttgctggctttgtcgtgtctct 480
A N V K L V F A R S Y G L A G F V R V S
gttaaggagcacaccataattgactcaaagcctgatcatttcttgatgaccttcgcttg 540
V K E H T I I D S K P D H F L D D L R L
aataatccatggcctgaactcaagagctttgtggagaccattgatctaatgtatcagat 600
N N P W P E L K S F V E T I D L N V S D
cctgtagctcataagcacataccttacgtcgtcattctgtgaagatggctgatgaatgg 660
P V A H K H I P Y V V I L V K M A D E W
actcagtcccatagtggaatcttctctcgaccaggggaagagaaaaagagttaaggatt 720
T Q S H S G N L L S T R E E K K S L R I
tggttagtccagatgatatctatggatgaggataactacaaagaagccattgaagccgct 780
W L V Q M I S M D E D N Y K E A I E A A
ttcaaagttttgctcctcgtggaatcagctcagagattcaacagattagcagtgatact 840
F K V F A P R G I S S E I Q Q I S S D T
tgtgctgaaccgagttcaaattcctcagatttttgggtgatggtagcggctctgaaggag 900
C A E P S S N S S D F W V M V A A L K E
ttgtcttgaacgaaggtgatggagagggcacccttgaaggctctataccagatatgaca 960
F V L N E G D G E A P L E G S I P D M T
tcgtcaacagagcattacatcaatttgcagaaaatatactagcgaagctgaggctgat 1020
S S T E H Y I N L Q K I Y L A K A E A D

tttcttgcacatggaggaacgagttaaaagtattttaagaaaatcggtagagatccgagc 1080
 F L V M E E R V K S I L K K I G R D P S
 agcatctcaaaccacaatcaagagcttctgtaagaatgcaagaaaacttaagtatgc 1140
 S I S K P T I K S F C K N A R K L K V C
 agataccgtatggttagaggacgaatntagtaatccttctgtaaccgaaattcaaaagtgt 1200
 R Y R M V E D E F S N P S V T E I Q K C
 ttagcggatgaggattacagtggtgcaatgggattttacatccttcttagagccgtggac 1260
 L A D E D Y S G A M G F Y I L L R A V D
 agatttactgccaaactataacaagtttctggccagtttgatggagggatggatgaggac 1320
 R F T A N Y N K F P G Q F D G G M D E D
 atttctcggttaaaactactgccttgagtctccttaccgacttgggatgtaacggctca 1380
 I S R L K T T A L S L L T D L G C N G S
 gtactgcccgatgaccttatcaatgagatgtgtcgttgggtgcctctgagcttcatgtg 1440
 V L P D D L I N E M C R F G A S E L H V
 gttgctgccttcttggaggaatcgcgcttcacgaggccatcaagcttggacaaaacag 1500
 V A A F L G G I A S H E A I K L V T K Q
 tttgttccgatgttggggacttacatcttcaatggcattgatcacaagtctcagttattg 1560
 F V P M L G T Y I F N G I D H K S Q L L
 gcattg 1566
 A L

>S-16(Leaf) EU186342

GGCCAAATGGCCATCACGACAACATOCATGTOOCATACATCTTTAGCAGCAAGAGAACTCAAACAGITTAATTTTCTTCAAAC
TAGITTTTTTTGGTTTTAGTTGGTATCCTOGGAAGAGAGAGAAAATGTTGGGAATTTTCAGOGGAGCTATAGTATCATTGCOGG
AAGAGCTGGTGGCTGCOGGGAACCGAACTOOGTGCOCGAAGACAACCGGATCGGTCTAGTCAACAAGITTCGTAGAGAAAAATCC
CTCTGCOOGTGTCCGTACAGGTGGGACTACGTGCAGCTTGTCTATAGCCACCACAAGAGAGTCTCTCOGGCCAAAGGTCATTT
GGGGCTAAGGATGAGATATTCTGCTTGTTCOAAGGCTCAGTTGACAACCTAGGAAGCOCTTAAACAACAATATGGGCTGGCAAAGA
ATGCAAAGAGGTTCTCTTGGTCAATTGAGGCTTACAAGACTCTCOGTGACAGAGCTOCTTAOCCAGCCAACCAAGTGTGTGACA
OCTAAGTGGOGATTTTGOCITTTGGTCTTTGATAAATCAAOCCTOACTCTGTTTGTAGCOCTCTGAOCCAAGAAGGTAAGGTAOCCA
TTGTACTGGGGGATAACAGCTGATGGGTATGTGGCATTGCTGATGATATTGAGTTGCTAAAAGGTGCTTGTGGCAAATCTCTTG
CTTCTTTTCCOCTAAGGCTGTTTTACTOGACTGCCTTAGGTGGGCTTAGGAGCTTTGAGAACCOCTAAGAACAAGATCACTGCCAT
TOCTGCTAGAGAGGAAGAAATTTGGGGAGOCACCTCAAGGTGGAAGGAGCAGCAGITTCCTGCACATGGAGAGTGAAGAATCAA
GATOCATCTCTTAATATCTAACTCCAACAGCAAACAAAATAATGATGTAGAGAAAAACAAGAAGCTGTTCTATGAGITTTTTTT
TTTTTTTAAATGTTATCAATGGTTGGTGTATGATGATGOGTGTAGTGTGTTCTCTCTTTTGTACAATCOGTGTCOGTCTCTCTG
CTGTTTGTAGTGACTTTGTCCOATAAGTTATGTCTCAAACTCAAAATCTACCTTCTCTTGATOCITTTTTTATCTCAAAAAA
AAAAAAAACATGGGCCATAAGGGCC

atgttgggaatttcagcggagctatagtatcattgccggaagagctgggtggctgccggg 60
 M L G I F S G A I V S L P E E L V A A G
 aaccgaactccgtcgccgaagacaaccggatcggtcctagtcaacaagttcgtagagaaa 120
 N R T P S P K T T G S V L V N K F V E K
 aatccctctgccgtgtccgtacaggtcggcgactacgtgcagcttgcttatagccaccac 240
 N P S A V S V Q V G D Y V Q L A Y S H H
 aaagagagtccctcaccggccaaggtcatttggggctaaggatgagatattctgcttgttc 300
 K E S P L R P R S F G A K D E I F C L F

caaggctcacttgacaacctaggaagccttaacaacaatatgggctggcaaagaatgca 360
Q G S L D N L G S L K Q Q Y G L A K N A
aacgaggttctcttggtcattgaggcttacaagactctccgtgacagagctcctacca 420
N E V L L V I E A Y K T L R D R A P Y P
gccaaaccacgtcgtgcacacctaagtggcgatthtgcctttgtggtctttgataaatca 480
A N H V V S H L S G D F A F V V F D K S
acctccactctgtttgtagcctctgaccaagaaggtaaggtagcttactgggggata 540
T S T L F V A S D Q E G K V P L Y W G I
acagctgatgggtatgtggcatttgctgatgatattgagttgctaaaaggctgttggc 600
T A D G Y V A F A D D I E L L K G A C G
aaatctcttgctctttccctcaaggctgttttactcgactgccttaggtgggcttagg 660
K S L A S F P Q G C F Y S T A L G G L R
agctttgagaaccctaagaacaagatcactgccattcctgctagagaggaagaaattgg 720
S F E N P K N K I T A I P A R E E E I W
ggagccacctcaaggtggaaggagcagcagttcttgcacatggagag 768
G A T F K V E G A A V L A H G E

>S-18(Leaf) EU186343

GGCCAAATCGGCATCACGGTGTCTCTCTACTTGGCTTGGAAOCCAGAGCTTCTTTOCCAAAAGAGAAATGGCTGCTTCAGCTGC
TGTAACCGCAAACACTACGTCTTAAGCOACCTOCATAOCCCTCTGGATGCTTTGGAGCOGCATATGAGCAAACAACTCTGGAGITTT
CACTGGGGAAAACATCACAGGGCTTATGTGGACAACCTCAAGAAACAGGTTCTTGGATCOGAGCTTGAAGGAAAGCOOCTTGGAGC
ATATCATOCAAACACTTACAACAACGGGACCTCTOCTCTTTCAACAACGCTGCTCAGGGGTGGAOCCAGAGITTTCTCTG
GGAATCAATGAAACCOGGTGGTGGAGGAAAACATCAGGAGAGCTTCTTGTCTGCTTGAAGAGATTTCACTTCTTATGAAAAG
TTCTATGATGAGITTCATGCOGCTGCTGCCACTCAATTTGGAGCTGGCTGGGCOCTGGCTTACGCAGACAACAACCTCAAAG
TAGTGAAAACCTOCAAATGCTGTGAACCCOCTTGTGCTTGGCTCTTTOCCATTGCTTACCATTGATGTCTGGGAGCATGCATACTA
TCTOGACTTCCAGAAOCCGAGACCOGGATTACATAAAGACATTCATGAACAATCTTGTGTCTTGGAGGCTGTTAGITOCAGACTT
GAGGCTGCOAAGGCTGCTTCTTCTGAGTCATCATCAGACTTATTOGGAOCCAAAATCTGACTTCAGITGTGTATGTTATGCATTA
CTGAAGITTTCTATAAAAATATTGGTOGOGGTTATAAAGACTGCTCTCTTGTGTAATGTCTCATOGAGTCTTTCATCTATTTCT
TTGTTTACTGAGATTTTATCATOGTGAATAAAGAACTAOCATGTTCTCTTGGGTGGTGGGTTATCTATATCTATATCTAAAA
AAAAAAAAAAACATGGGCATAAGGCC

atggctgcttcagctgctgtaaccgcaaactacgtccttaagccacctccataccctctg 60
M A A S A A V T A N Y V L K P P P Y P L
gatgctttggagccgcatatgagcaaaactctggagtttactggggaaaacatcac 120
D A L E P H M S K Q T L E F H W G K H H
agggcttatgtggacaacctcaagaacaggttcttggatccgagcttgaaggaaagccc 180
R A Y V D N L K K Q V L G S E L E G K P
ttggagcatatcatcaaaacacttacaacaacggcgacctcctccctcctttcaacaac 240
L E H I I Q N T Y N N G D L L P P F N N
gctgctcaggcgtggaaccacgagttcttctgggaatcaatgaaacccggtgggtggagga 300
A A Q A W N H E F F W E S M K P G G G G
aaacatcaggagagcttcttctgcttgaagagatttcacttcttatgaaaagttc 360
K P S G E L L A L L E R D F T S Y E K F
tatgatgagttcaatgccgctgctgccactcaattggagctggctgggctggctgct 420

Y D E F N A A A A T Q F G A G W A W L A
 tacgcagacaacaaactcaaagtagtgaaaactccaaatgctgtgaacccccctgtgctt 480
 Y A D N K L K V V K T P N A V N P L V L
 ggctctttccattgcttaccattgatgtctgggagcatgcatactatctcgacttccag 540
 G S F P L L T I D V W E H A Y Y L D F Q
 aaccgcagaccggattacataaagacattcatgaacaatcttgtgtcttgcgaggctgtt 600
 N R R P D Y I K T F M N N L V S C E A V
 agttccagacttgaggctgccaaggctgcttctcc 636
 S S R L E A A K A A S S

>S-19(Stem) EU186357

GGCCAAATCGGCCATCACGGAAOCCAAAAAAGTTGCTGCGGTGCGCACATTTTCTCTGTGCTGGTGGCTTGTATTGGTGGCA
 ACAAACCTGTCTCTOOGTCTOOGTTAAGACAGCAATGTTGGTTTCCGACAAGOOOOGTCTAATGATTTCTACAAAGACGATAAC
 AACACCAATTOCTOCACOGCOGCAACATGATTATOGAOGGAGATCTACAGCOGCACAATCATCACOCTCACCAACATCACA
 ATCACCATCATATAATCATCTOCAGCOGCAACAGATTCTCTTAGGCGAAAGCAGOGGCGAGGATCACGAAGTGAAAGCTOCCAA
 GAAACGAGCAGAGACGTGGGTCCAAGACGAGACOOOOGTTOOCTAATCATGTTCCGTCGAGGCATGGAOOGGCTCTTCAACACCTOC
 AAGTCTAACAAACATCTCTGGGAGGAGATCTOOGGCAAGATGAGGGGAGAAAGGGTTCGATOGATCTCOGACGATGTGTACGGACA
 AGTGGAGGAATCTGTTGAAGGAGTATAAGAAGGCOAAGCATCACGACAGAGGAATGTGTGGGCAAGATGTCTTATTACAAGGA
 GATTGAAGATATTCTTAGGGAGAGGAGCAAGAAAGTGACGACACAGTATAGCAAGAGTCTAATACACOOOOCATTGCTAAAGTT
 GATTOCTTTATGCAATTTACTGATAAAGGTTTTGATGATOOAGCATTCTTTTGGATOOGTTGAAGCTAATGGCAGGCOOGGGGT
 TAAOCTTGAAGGAGTCTTGATCATGATGGTCATCCTCTTGAATCACTACAGTTGATGCTGTTCCAGCAAATGGAGTTOCTOC
 TTGGAATTGGAGAGAGACTOCTGGAAAOGGTGGTATGCTCATGGACAGOCITTTGGTGGGAGGGTCATAACTGTGAAATTTGGC
 GACTATACAAGAAGAATOGGOGTTGATGGCACTGCTGAAGCAATCAAAGAGACAATCAGGTCTGCTTTTAGOCTAAGAACCAGGC
 GGGOCITTTGGTTAGAAGATGAAGATCAGGTTGTTGTTGTTGACCOGAGACATGCOCTTTAGGGAACATCTACTOCATGTGGA
 TGGTGGAGTGGOCATTAGGGTTTGOCATTACGATGAATCCAAOCAGTTACCAGTCCATACAGAAGAGAAGATCTTCTACACAGAA
 GAAGATTATOGGATTTTCTGGCTAGACGAGGATGGACATATCTGCAAGTTGATGGCTTTAGGAACATAGACAACATGGATGATC
 TTCAAGCTGGTGTGTGTACOGAGGAGTGAGAGAGAGAATGTGATCACGGTAACTTCTTATCCAAAGTCCATCAACGGCTTAATTT
 AATCACAGAACTGTCCCTGTAATGTATATTTCCATTCCATTGTAAATTCOOGCOCTTTTGTTCOOCTGAGTAGAACAAAAAG
 TTTGGATTACCTTACAGGCCAAATAAGACCTCAAATTTGATTTTTGTTGTTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGACGGCCATAAGGG
 CC

atgttcgtttccgacaagccccgtcctaataatgatttctacaaagacgataacaacaccaat 60
 M F V S D K P R P N D F Y K D D N N T N
 tcctccaccgcccgcacgcaacatgattatcgacggagatctacagccgcacaatcatcac 120
 S S T A A R N M I I D G D L Q P H N H H
 cctcaccacaatcacaatcaccatcatcataatcatctccagccgcaacagattctctta 180
 P H H N H N H H H N H L Q P Q Q I L L
 ggcgaaagcagcggcgaggatcacgaagtgaaagctcccaagaaacgagcagagacgtgg 240
 G E S S G E D H E V K A P K K R A E T W
 gtccaagacgagaccggttcctaataatcatgttccgtcgaggcatggacggcctcttcaac 300
 V Q D E T R S L I M F R R G M D G L F N
 acctccaagttaacaaacatctctgggaggagatctcggcgaagatgagggagaaaggg 360
 T S K S N K H L W E E I S A K M R E K G
 ttcgatcgatctccgacgatgtgtacggacaagtggaggaatctgttgaaggagtataag 420
 F D R S P T M C T D K W R N L L K E Y K
 aaggccaagcatcacgacagaggggaatgtgtcggcgaagatgtcttattacaaggagatt 480

P T P S R P L A S V S A I S R R I S R R
 tctctgacttcttctagaccttccacttcccttccaaattcgttatccactgcatgtct 180
 S L T S S R P S T S S S K F V I H C M S
 agtgtcaccgatgtgccacctgtatcggagacgaagtcgaattcctcaaagcttacaag 240
 S V T D V P P V S E T K S N F L K A Y K
 cggcccatcccaagcatctacaacaccgtgttacaggagctcatcgtacagcagcatttg 300
 R P I P S I Y N T V L Q E L I V Q Q H L
 atgaggtaaaaaggacttaccgatacgacccccgttttcgcactcggccttgtaaccgtc 360
 M R Y K R T Y R Y D P V F A L G F V T V
 tatgatcagctcatggatggatatccgagcgatcaggatcgtgattccattttccaagct 420
 Y D Q L M D G Y P S D Q D R D S I F Q A
 tacgttgaagctttgaatgaggttccctaagcaataccgaattgatgcgcagaagatggag 480
 Y V E A L N E V P K Q Y R I D A Q K M E
 gaatgggcgagaagccagacgtctgcttactagttgacttctccttaaggaaggagaa 540
 E W A R S Q T S A S L V D F S F K E G E
 gttgaagcgattcttaaggacattcagaaagagctggcagtaaggaggggttcagttac 600
 V E A I L K D I S E R A G S K E G F S Y
 agcaggttctcgcgtgttggcctctttcgcttgcttgagcttgctggtgctactgatcct 660
 S R F F A V G L F R L L E L A G A T D P
 accgtccttgacaagctttgtgcatccctaaatatcaacaagaaaagcgtggatcgggac 720
 T V L D K L C A S L N I N K K S V D R D
 ctcgatgtgtatcgcaacctctgtcaaagctgtccaagccaaggaactgctcaaggag 780
 L D V Y R N L L S K L V Q A K E L L K E
 tatgtcgagaggggagaagaagaagagagggggaaagagcc 819
 Y V E R E K K K R G E R A

>S-21(Stem) EU186359

GGCCAAATGGGOCATCAGATTCCGCTOCCAGAAAAATATCTTCGGCTCAGGAGAAAGACTGTGATOGATGGGGGAGGGTGAAGT
 TAOGCCCCACCTCGTAAAGTTCTCATCATATCCGCTGGTGTAGCCACTCCGCTCCTCCTCCTGGAGAGGGTTGTTTGCTCA
 TGGGGTCCGAGGAGGATGGACAGTTAGGTCACGGAGACGCAGAGGATOGATCTTCCCGAOCAGCTAAGCGOCTTGGATGAAC
 ACCAAATOGTTTCCGTTAOCCTGTGGTGTGACCCACCCGTTGCTTATTACAGTCAOCCTTGGAGGTCTATAGTTGGGGATGGGG
 TGATTTTGGGAGATTAGGCCATGGGAACCTGAGTACTTGTACTCCGCTOCCAATAAAAAGCATTGCAOAGGTGTTATGATAAAG
 CAGATTGCTTGTGGGATAGTCATTGTTGGCTGTGACTATGGATGGAGAGGTGCAGAGCTGGGGGGCAACCAGAATGGTCAAC
 TTGGTCTAGGGAACACAGAAGATTCTCTAGTGOCTCAGAAGATTCAAGOCITTTGAGGGAATAOCAATCAAAATGGTTGCTGCTGG
 TGCAGAACACACTGCTGCGGTTACAGAGGATGGTATCTTTATGGATGGGATGGGAAGATATGGAAATTTGGGATTAGTGAOCCG
 AATGAOCCTTGTTOCTGAAAGAGTACCTCTGCTGTGTGAGAGATGTGATGGTGTGATGCAGCCACATATCAGTTTCTTAC
 TCTGGAGCATTATATACTTATGGATGGAGCAAATATGGCCAACTAGGACATGGAGACTTGGAGGATCACCTTGTTOCTCACAAA
 CTGGAAGCGCTCGGCAACAGOGTTTTCTCTCAGATTTGGGAGGCTGGAGACATACAATGOCATTGACTTCTGATGGAAAAC
 TATGGATGGGGTTGGAATAAGTTTGGACAAGTAGGAGTGGGCAATAACTTAGATCAGTGTCTCCTGTGCAAGTGGGATTTCCCG
 AOGATCAGAAAGTAGTTCCAGTCTCATGTGGATGGAGACATAOCTTGGCTGTGACTGAAAGAAAACAATGTGTTTGGTGGGCGAG
 AGGTACAATGGACAGCTCGGTATTGGAGAATCACTTGACAGGAATCTOCCAATATCATAGAGGCACTGAGTGTGATGGAGCA
 AGTGGACAACATATAGAATCTTCTAGTTTGTATCATCTTCAGGGAAAAGTTGGGTGTACCTTCAGAGAGATATCGGGTTGTTT
 CTGGTGAACCTGGACAACTGATAGTACAAGCAAAGGCAATGGAGGTGATATCAGTGTCCACAACTGATGCCAAGCGTGTTCG
 ACTTTGAGCTGAGAGAAAATTTCTTTAATTGTTCTTTTGGCGTGTGGTCTCGAAGGTTATCAATGTACTATGTCTAGTTTG
 AGGTTTGCCTCTTTTTTTTTGTTGCTGTAGTTTGGCCGTTGTAACCTGTTAATGOCTATTTCTCCTCTTGGGTTCTTTCCG

ATAAGTAAGATGGATAAGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGAGGCCATAAGGGCC
atggcggagggtgaagttacgccccacctcgtaaagttctcatcatatccgctggtgct 60
M A E G E V T P P P R K V L I I S A G A
agccactccgctcgctctcctctctggagaggtgtttgctcatggggctcaggagaggat 120
S H S V A L L S G E V V C S W G R G E D
ggacagttaggtcacggagacgcagaggatcgatcttccccgacgcagctaagcgccttg 180
G Q L G H G D A E D R S S P T Q L S A L
gatgaacaccaaatcgttccggttacctgtggtgctgaccacaccggtgcttattcacag 240
D E H Q I V S V T C G A D H T V A Y S Q
tcacgcttgagggtctatagttggggatgggggtgattttgggagattaggccatgggaac 300
S R L E V Y S W G W G D F G R L G H G N
tcgagtgactgtttactccgctcccaataaaaagcattgcacggtgttatgataaagcag 360
S S D L F T P L P I K A L H G V M I K Q
attgctgtggggatagtcattgtttggctgtgactatggatggagaggtgcagagctgg 420
I A C G D S H C L A V T M D G E V Q S W
ggcgcaaccagaatggtcaactggcttagggaacacagaagattctctagtcctcag 540
G R N Q N G Q L G L G N T E D S L V P Q
aagattcaagcctttgaggggaatacgaatcaaaatggttgctgctggtgcagaacacact 600
K I Q A F E G I R I K M V A A G A E H T
gctgcggttacagaggatggtgatctttatggatgggatgggaagatatggaaattggg 660
A A V T E D G D L Y G W D G K I W K F G
attagtaccggaatgaccgctgttctgaaagagtacctgctgtgtgagagatgtc 720
I S D R N D R L F L K E Y L C C V R D V
gatggtgctgtgatgcagccacatatcagtttctactctggagcattatatacttatgg 780
D G A V M Q P H I S F L L W S I I Y L W
atggagcaaatatggccaactaggacatgggagactggaggatcacctgtttcctcaca 840
M E Q I W P T R T W R L G G S P C F L T
aactggaagcgctaggcaacagcggttttctctcagatttcgggaggctggagacataca 900
N W K R S A T A F F S Q I S G G W R H T
atgccattgacttctgatggaaaactatatggatgggggttgaataagtttgacaagta 960
M P L T S D G K L Y G W G W N K F G Q V
ggagtgggcaataacttagatcagtgttctcctgtgcaagtgcgattcccgcagatcag 1020
G V G N N L D Q C S P V Q V R F P D D Q
aaagtagttcaggtctcatgtggatggagacatacctggctgtgactgaaagaaacaat 1080
K V V Q V S C G W R H T L A V T E R N N
gtgtttgctggggcagaggtacaaatggacagctcggtattggagaatcacttgacagg 1140
V F A W G R G T N G Q L G I G E S L D R
aattctccaaatatcatagaggcactgagtggtgatggagcaagtggacaacatatagaa 1200
N S P N I I E A L S V D G A S G Q H I E
tcttctagttttgatccatcttcagggaaaagttgggtgtcaccttcagagagatatgcg 1260
S S S F D P S S G K S W V S P S E R Y A
gtgttctggtgaaactggacaaactgatagtacaagcaaggcaatggaggtgatatc 1320

V V P G E T G Q T D S T S K G N G G D I
agtgtcccacaaactgatgccaagcgtgttcgactt 1356
S V P Q T D A K R V R L

>S-22(stem) EU186360

GGCCAAATCGGCCATCACGAGATATTTGAGAAGAAGAAGAAGAGATCGAGAGGGAGCCGACAAGAGTGATGGTGGCTGTGAA
TGAATCGAOGATCAAAGGGGAAGCCCCACCCCTTGGATAAGCAGCAAAAAGAGCTTTGGAATGGACTCTGGAGAAGATGATCOGATOC
AACACATCOGATTTCAAGATTCTCTTGTCTOCATGTACATGTGGTOGACGAAGACGGTTTTGATGAGGTAGACAGCATATATGOCT
CTCOOGATGATTTCAAAGAGTCTAACAAGTCTAAAGGTCTTCAOCTTCTOGAGTTTTTGGTTAAAAAATGTCATGAGATTGGGGT
TAGITGOGAGGCATGGATCAAGAAAGGTGATCOCAAGGATGTGATCTGCOAAGAAGTCAGCOGGGTGACACCAGATCTTCTTGT
TTGGGAAGCOGTGGTCTTGGCOGCTTCCAAAAGGTCTTGTGGGAOOGTGAGTGGGTCTGTGTGAAAACATGCTGAGTGTOCAG
TOCTCAGATCAAAGCAAGCOGATGAACTOOCAGTATCTTGTGATGACTAAOCCAACTACATTCTAAAACATTOCTTCTT
CCAAAATGATAATAAACTCTOCCATTGATOCCTATOCCATTGTGTGCTTTTGTGTGTCCAAGTTTATGATTAATAATATTGTATG
TGTGTGAAGTCTGCTATGTTTCTGTTGTGCTGATACTGATAATGCAACTAACTTTCAATTTCTTTTAAATCATTCTAAATTGA
ATAAAAGGTGTTATATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGAGGCCATAAGGCC
atggagaggggagccgacaagagtgatgggtggctgtgaatgaatcgacgatcaaaggaag 60
M E R E P T R V M V A V N E S T I K G K
ccccacccttcgataagcagcaaaagagctttcgaatggactctggagaagatgatccga 120
P H P S I S S K R A F E W T L E K M I R
tccaacacatccgattcaagattctcttgcctcatgtacatgtggctcgacgaagacgg 180
S N T S D F K I L L L H V H V V D E D G
ttgatgaggtagacagcatatatgcctctcccgatgattcaagagtgtaacaagtct 240
F D E V D S I Y A S P D D F K E S N K S
aaaggtcttcaccttctcgagttttcgttaaaaaatgtcatgagattggggtagttgc 300
K G L H L L E F F V K K C H E I G V S C
gaggcatggatcaagaaaggtgatcccaaggatgtgatctgccaagaagtcagccgggtc 360
E A W I K K G D P K D V I C Q E V S R V
cgaccagatcttctgttttgggaagccgtggcttggccgcttccaaaaggtctttgtt 420
R P D L L V L G S R G L G R F Q K V F V
gggaccgtgagtggttctgtgtgaaacatgctgagtgctcagtcctcacgatcaaacgc 540
G T V S G F C V K H A E C P V L T I K R
aacgccgatgaaactcccagtgatcttgctgatgac 576
N A D E T P S D L A D D

>S-23 (Stem) EU186360

GGCCAAATCGGCCATCACGATTAACGAAGACATGGAGCTTTCTTCTCTCAAGCTTTCATGCOGTTATCTOCTTCCATOGT
CAACAACCTTCAGGGTCTTCATCAAGTTATAAAGTAAAGTCTCTAACAACACTTCACTOCCATAAOCGTTTCTTCAACTTGAT
GATAGAGGCCAAGTCTTGTGACCAACACGCTTCACTTCTTCTGTCTATCTAAGGTCATTTAGAAAAOCCGTTCTTCAACTTGAT
CAGAAGGATCACAAGGCTGGGACATTGGGAGGTTCACTAAAACATTGTACTTCTTCAOCCGACCOCTCTOCTCTAAAGTTTGT
TTCATCAGTGTITGAGAACTTAOCCAOGGATCAACAOCGGAGGAOCCGTGTAATGAAATGGAACCTTCTGGAATCATACTTGTG
GCTGGAGCTACTGGTGGTGTGGTAGAAGGGTGTGATATCTTGAGGAGTAGAGGGTTGCOCTGTTAAAGCATTGGTTAGAAATG
AAGAGAAGGCTOCCGAAGATGTTAGGAOCTGACATTGACTTGATTGTGGCAGACATTACAAGGAGAACACACTGGTTOCTGAGAA
GTTTAAAGGAGTGAGGAAAGTGATCAATGCTGTTTCTGTATAGTGGGTOCAAAGGAAGGAGATACACCTGAGAGACAAAAGTAC
AATCAGGGAGTCAGGTTCTTCCAGCCAGAGATAAAAAGGCGACTOCCOAGGTTAGTGAATAACATTGGAATGAAGAACTTAATCA
ATGCTGTTAAAAATGGTGTGGACTTGAGAATGGGAAGCTTCTTTTGGTGTGGGATAACACATTTAAAGATCTAOCCTGGGG

AGCCTTGATGATGTTGTAATGGGAGGTGTCAGOGAAAGTAACTTCATAGTAGATTTAACGGGGGTGAAAAAGGTGGACCTACC
GGCATTTCAAAGGAAATGTTTCAACGACAAATAATGGGGATTCACTAGTGTAGGACCAAGAATTTTCCAGAGGCAGAGGATC
TTTCCGCATATGATGGTTTGGAGTTACGGCTAAAAGGAGAGCGGCTCOGTTACAAGCTTATCGTCCGGACAAGCCAAGATTGGGA
CACTGTTGGTTACACCGCTAGTTTGGACACTTCAACAGGCCAATGGCAATCTGTACGCTTACCTTTCTCGTCTTTAAGACCTGTG
TTTGGTGAAGGACAAAGTCAGATGCAOCTOCTTTTAAATCCAGOCAGTATCATTTCACTACAGCTTATGTTTAGCAAATTTGAGT
ATGAOAGTAAGCTAAACCCACATTCAAAGAAGGAOCCATTGAGCTTCTCTATOGACCAATTGAGCATAACATTCAAGATCCOOGT
TACTCCAAGGTTTGTTCATGTTGGCTCTGOGGGAGTAACCCGACCAGAGAGACCTGGTTTGGATCTAACCAACAACCTOCTGOC
GTTAGATTAACAAGGAGCTTGATTTCACTOCTCACTTACAAGCTAAAGGGAGAGGATCTGATAOAGTAAAGTGGGATAOCCATATG
CGATAGTAOAGGOCATGTGCTTTAACAGAAGAGCCTGCAGGAGCTGATCTCATTTTGGATCAAGGGOGACAACATTACGGGGAAGGT
ATOGAGAGAGAAGTAGCAOCTATATGCATOGCTGCTTTAGAAAGCTOGTCTGCTCTAAACAAGACATTGAGGTTAAAAGCAAG
GTTCCGTTTAGGCAOCCATTACAGTAGATCTGAGAATCTOCCACCAGAGAAAGACTACAATGAGTACTTCAAGAATCTTAAAG
ATGGAATCACTGGCAAAGAAGCTTTGGAACAGAGCACTGTTTCTGTTTAAAAAAACCAAGGCTCTTTCTGCTCTGTTTTCTTT
TTTAACTACAAAAAAAATAAAGGTTGTATATCCATATGTACAAGGCTCGGTACATTGAAGAGTGTTCCTTTTTTAAATAGAAAG
ATGCGTTGCTTATGGACGAAAGTACATAATCATTGAGCGCTGTTTTCTCTCCAAAAAAAAAAAAAAAAACTGAGGOCATAAGGGC
C

atggagcctttcttctctcaagccttcatcgccggttatctccttccatcgtcaacaac 60
M E L S S S L K L S S P L S P S I V N N
cttcaggggtcttcatcaagttataaagtaaagttcttaacaacacttcactccctaaa 120
L Q G S S S S Y K V K F S N N T S L P K
ccgtttctcaactgatgatagaggccaacgtcttcgtgaccaacacgcttcacattct 180
P F L Q L D D R G Q R L R D Q H A S H S
tctgtctatctaaggctcatttagaaaacgggtcactgctaaatcagaaggatcacaaggc 240
S V Y L R S F R K R V T A K S E G S Q G
tgggacattgggaggttcatcaaacattgtacttctcaacggaccaccctctcctcta 300
W D I G R F I K T L Y F F N G P P S P L
aagtttgttcatcagtgtttgagaaacttaccacgggatcaacaacggaggaacctgtt 360
K F V S S V F E K L T N G S T T E E P V
aatgaaatggaaacttctggaatcatacttgtggctggagctactggtggtgtaga 420
N E M E T S G I I L V A G A T G G V G R
agggttgtagatcttgaggagtagagggtgcctgtaagcattggttagaaatgaa 480
R V V D I L R S R G L P V K A L V R N E
gagaaggctcggaaagatgtaggacctgacattgacttgattgtggcagacattacaaag 540
E K A R K M L G P D I D L I V A D I T K
gagaacacactggttctgagaagtttaaggagtgaggaaagtgatcaatgctgtttct 600
E N T L V P E K F K G V R K V I N A V S
gttatagtgggtccaaaggaaggagatacacctgagagacaaaagtacaatcagggagtc 660
V I V G P K E G D T P E R Q K Y N Q G V
aggttctcgagccagagataaaaaggcgactcgcccgagttagtggaatacattggaatg 720
R F F E P E I K G D S P E L V E Y I G M
aagaacttaataatgctgttaaaaatggtgttgactgagaatgggaagcctcttttc 780
K N L I N A V K N G V G L E N G K L L F
ggtgtggggataacacatttaagatctaccttggggagcctggatgatgttgaatg 840
G V G D N T F K D L P W G A L D D V V M
ggaggtgtcagcgaaagtaacttcatagtagatttaaccggcggtgaaaacggtggacct 900
G G V S E S N F I V D L T G G E N G G P
accggcatttcaaaggaatgttcaacgacaaataatggcggattcactagtgtagg 960

T G I F K G N V S T T N N G G F T S V R
 accaagaatttccagagggcagaggatctttccgcatatgatggtttgagttacgggcta 1020
 T K N F P E A E D L S A Y D G L E L R L
 aaaggagacgggctccgttacaagcttatcgtccggacaagccaagattgggacactggt 1080
 K G D G L R Y K L I V R T S Q D W D T V
 ggttacaccgctagtttcgacacttcaccaggccaatggcaatctgtacgcttacctttc 1140
 G Y T A S F D T S P G Q W Q S V R L P F
 tcgtcttaagacctgtgttcgtgcaaggacaaagtcagatgcacctcctttaatcca 1200
 S S L R P V F R A R T K S D A P P F N P
 gccagtatcatttcactacagcttatgtttagcaaatttgagtatgacggtaagctaaac 1260
 A S I I S L Q L M F S K F E Y D G K L N
 cccacattcaaagaaggaccattcgagcttctctatcgaccattcgagcatacattcaa 1320
 P T F K E G P F E L P L S T I R A Y I Q
 gatcccgttactccaagggtttggtcatgttggtctgcgaggagtaacccgaccagagaga 1380
 D P V T P R F V H V G S A G V T R P E R
 cctggtttgatctaaccaaaacaacctcctgccgttagattaaacaaggagcttgatttc 1440
 P G L D L T K Q P P A V R L N K E L D F
 atcctcacttacaagctaaagggagaggatctgatacgtgaaagtgggataccatgatcg 1500
 I L T Y K L K G E D L I R E S G I P Y A
 atagtagcggccatgtgctttaacagaagagcctgcaggagctgatctcattttcgatcaa 1560
 I V R P C A L T E E P A G A D L I F D Q
 ggcgacaacattacggggaaggtatcgagagacgaagtagcacgtatatgcatcgctgct 1620
 G D N I T G K V S R D E V A R I C I A A
 ttagaaagctcgtctgctctaacaagacattcgagggttaaagcacgggtccgtttagc 1680
 L E S S S A L N K T F E V K S T V P F S
 gaaccattcacagtagatcctgagaatcctccaccagagaaagactacaatgagtacttc 1740
 E P F T V D P E N P P P E K D Y N E Y F
 aagaatcttaaagatggaatcactggcaaagaagctttggaacagagcactgtttctggt 1800
 K N L K D G I T G K E A L E Q S T V S V

>S-24(flower) EU186323

GGCCAAATGGGCATCACGGCCAATCAAAACACAAAAACACAACAAAACCTCAATAAATAAACAAATGGCAGACAACAAGCAGA
 GCTTCCAAGCCGGTCAAGCCGCTGGTGTGCTGAGGAGAAGGGTAATGTGCTGATGGACAAGGTCAAGGATGCTGCTACCGCAGC
 TGGAGCGTCTCGCCAAACCGGGGACAGAAGATAACGGAGGCGCCAGGGGGAGCCGTTAATCTCGTGAAGGAGAAGACCGGCATG
 AACAAGTAGCCCCATTGGAATAAAATTGGGAGTTATAGTTTCCCTTTTAAATGTTAATCGTTGTGGTTTTAAATAAAAATTGGG
 TGTTCTAATTGATCTTCACCGTAGTTGTTGTTGTTGTTTTAGTGTTTGAAGTAATGTTTTCAACCTTTAGGTGTATGTCTT
 GATGTTTATGTACTTAGTTCCCTTAATGAACATCTGATTTAAGCTTCAAGTCCAAAAAATAAATACGGGCCATAAG
 GGCC

atggcagacaacaagcagagcttccaagccgggtcaagccgctggtcgtgctgaggagaag 60
 M A D N K Q S F Q A G Q A A G R A E E K
 ggtaatgtgctgatggacaaggtcaaggatgctgctaccgcagctggagcgtctgcgcaa 120
 G N V L M D K V K D A A T A A G A S A Q
 accgcgggacagaagataacggaggcggcagggggagccggttaatctcgtgaaggagaag 180
 T A G Q K I T E A A G G A V N L V K E K

accggcatgaacaag
T G M N K

195

>S-25(Flower) EU186325

GGCCAAATCGGCCATCACGTCCTTTCTCTTTCCATTTCACTGTTCAAGTTGAAACCAAAGACTCTTCACTTTCTOCTACAATA
GACTOCTACACCTACTCTTTCTCTCTCTTGATTCTAGCTACAAAAACGTTATAGTTOCCATCACAATACTOCCAAAAATGCAATT
TTCAAGAACTCAATCCTTAGACAACCTAAGCAGAAAAGAAGGTTGGAGGTGGCTTCTAGAAGGTGGACATCOGGAGATAGCTCA
ACGGCTTTCGGGACGACACAAGCGGTGGTGGTGGGTTACTCTTCAATGGAGGGCTGTATGGGGTTAATTCGGTGAAGATC
CGGGGGGAGAAGGAAAAAGTGTGGTGGTGGATGAGGCTTCAAGGTOCAACATGCTATGATGTGGGCTTTGAOCCACTT
GACTAACAAAGGAGACTTGATGACTCTTCTTTCATGTTGTGTCTOCTCATGATGAAGCTTCTTCTTTGGTTCAGTCACTTGGT
TCTCTTTGCAAAGCTTGTAAACCGAGGTGGATGTGGAGGCGTGGTGTTCAGGACCAAAAGTTAGCAACTGTAAGTCAAG
TGAAGAACTTGAAGTCACTGTTCTGTTTTGGGTCAGAAGAAATCTGCACCATTCTCTCTGTTTATGTGGACCCAGTATGATC
AGAGGAGCTCGTGAATCGATGTATCAATGGTGCAGATTGTTTGAOCTTGGTGTGAGGAAACAAAGCAACGGTGTAGTGGCTAC
TTGATTAACACAGATGGCAGAAGAAGTCTGGCTTCTGGCTAATGCAATTTTAACTTAGCAGCOGTAGAATGGTTCATC
AGTTGGTGTAAATTTAGTGAATAAACTATGGATCTCTTCTTGTCCATGTTGAACATAACTTTGTCTTATGTCOOGTAAGAA
ATTAAGTTTAACTATTTGTATCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAATACGGGCCATAAGGGCC
atgcaatthcaagaaactcaatccttagacaactaagcagaaaagaaggtggaggtcg 60
M Q F S R N S I L R Q L S R K E G W R S
gcttctagaaggtggacatccggagatagctcaacggccttcgccgacgacacaagcgg 120
A S R R W T S G D S S T A F A D D T S G
ggtgctggcggttactcttcaatggagggcctgtatggggtaattccggtgaagatccg 180
G A G G Y S S M E G L Y G V N S G E D P
gcggcgagaaggaaaagagtgtggtgtgggtgaggttcaagggtccaaacatgct 240
A A R R K R V M V V V D E A S R S K H A
atgatgtgggctttgacgcacttgactaacaaggagacttgatgactcttctcatgtt 300
M M W A L T H L T N K G D L M T L L H V
gtgtctctcatgatgaagcttcttcttgggtcagtcacttgggttcttcttggaaa 360
V S P H D E A S S S L V Q S L G S L C K
gcttgtaaaccggaggtggatgtggagggcgttgggtgattcaaggaccaagttagcaact 420
A C K P E V D V E A L V I Q G P K L A T
gtactcagccaagtgaagaaacttgaagtcactgttcttgggtcagaagaaatct 480
V L S Q V K K L E V T V L V L G Q K K S
gcaccattcatctcctgtttatgtggaccagtagatcagaggagctcgtgaatcgatgt 540
A P F I S C L C G P S R S E E L V N R C
atcaatggtgcagattgtttgacgattggtgtgaggaacaaagcaacggtgttagtggc 600
I N G A D C L T I G V R K Q S N G V S G
tacttgattaacacacgatggcagaagaacttctggcttctggcc 645
Y L I N T R W Q K N F W L L A

>S-26(stem) EU186362

GGCCAAATCGGCCATCACGACACATOGTGTGTTTGTATCAACTTGAGOGAGTTGCAGATATTTTACAGGCCAAGATCTAA
GATCOGAGTTACAAAGCAAAATGGCGATGGITTCAGGAAGACGTTCTAAGCTAAACCCAAAGGCGCTCTCTTTGTCCAGCAGC
CGTTAGACAAGTGAAGATTTCTCTCOGGAGTGGTGGCAGTTGGTGAOACCTOGACTTGGTAOCATGACTACTGGATCAGOCAG
CAOAAAGGAGCTGAOAGATTCTAOCACAACGGAGAGAGTCAAGAAGTGOATGTAGCTGATCTTCTTTOGGAGTGTGTTGATTOG
ATGACATTGAAGATGCTTGOAATCOGAGTTGATCATCAAGGTTACGGTGGATATGTTGGACAACAGATGTATCATGCACCTTC

TGACTTTGGTTTAGGAAGAATGGTGAGATGGTGAGGAAATOGAGTGGGAACAGGAGTOCTAGGTOGATTGTTGAACCGGOGAAG
 TATGCAGAGAAGCCAGOCOAATGGGGGAACCAGAAGGTTGCTOACGAAACATTCAACAGCCTCGTTGAAGTGCAAGTTAACTA
 GGCAGAGTATGTTGTATCTTTAGCCACTTGTACCTTTGTAATTTTTAGTATTTTCTGCTTTCCACAAGAGAGAGAAOCTGTA
 TCTTTGTACCTTTATGATGTTCACTCTCAAACCTGTTATCTCAAAGAAAAATGTAAAAACATAGAAAATTGTAATTTGAGAGAA
 TGAGTACTAGAGTTACACAAAAAATAAAAAAAAAAATACTGAGCCATAGGGCC
atggcgatggtttcaggaagacgttctacgctaaacccaacgcgcctctctttgtccca 60
 M A M V S G R R S T L N P N A P L F V P
 gcagccgtagacaagtggaagatttctctccggagtggtggcagttggtgacgacctcg 120
 A A V R Q V E D F S P E W W Q L V T T S
 acttggtaccatgactactggatcagccagcaccaggagctgacggattctacgacaac 180
 T W Y H D Y W I S Q H Q G A D G F Y D N
 ggagagagtcaagaagtcgatgtagctgatcttctccggagtcggttgatttcgatgac 240
 G E S Q E V D V A D L L P E S F D F D D
 attgaagatgcttcgaatccgagttgatcatcaaggttacggtggatatgttggacaa 300
 I E D V F E S E F D H Q G Y G G Y V G Q
 cagatgtatcatgcacctctgactttggttagggaagaatggtgagatggtgaggaaa 360
 Q M Y H A P S D F G L G K N G E M V R K
 tcgagtggaacaggagtcctaggtcgattggtgaaccggcgaagtatgcagagaagcca 420
 S S G N R S P R S I V E P A K Y A E K P
 gccaaatgggggaaccagaaggttgctccacgaaacattcaccagcctcgt 471
 A K W G N Q K V A P R N I H Q P R

>S-27 (Stem) EU186363

GGCCAAATGGGCATCACGGCAATCAAAGGTTACTTTCCTTTTTAAAAAGGTGACTTCAAATCTGAACCCCTTCCCCAGAGAT
 TGGTAGATGGAGTTGAATOGTTTCTAGTGTCTTAGGGAGTGCAGCAGTCATCTTGGTGTCTATGCTCTCTCACTGGC
 TCTCTGTAGACCCGGTAAAGTTGGTTTATTAACCGAACCAGGATCTGAAAGGAATGGATOCATGGGAAGGCAGCTCTGACC
 CGAAACCCATTTGCTGGATCCGGAAGCTTTCCTTCCACGAAACAGAGCTGTTAAGCTGTCCGGGTGATACCGCGCTCT
 ACTTGTCTCTTGTAGCACTGTTCTTGGGATATTTGCTTTGTGGCTCTCTCTCTTCCGACTCTACTCCCTTTATCCGCTAC
 TGACAACAGCTTAAAGACCTCAAGGAACGTCACTGACACCCACAAGTAACGGAAACCTTTAGCCAACTTGATAATCTATCTATGGCT
 AACATCACTAGAAGGAGTTCAAGGCTGTGGGGTTCCTAGGAGCGGTTTACTGGGTATCTCTAGTACATATTTTATGTTATGGA
 AAGCTTACAAGCAGTGTCTGCACTGAGAGCTGAAGCTCTGATGTCTAGTGAAGAAGTATTACCAGAGCAATAACGCTATTTCTGT
 TAGGGATATACTTCCCACTAAAGGAGAGACGAGAAAGGTTTGGTGGATTCTTACTTCCAGAGAAATCTAACCAGAGACATTC
 TACAGATCCCTGTGTAACAGAAAACAGCAAGATTAATAAGATATGGGAAAACCTTGAAGGCTACAAGAAGAAGCTGGGGGGG
 CAGAAGGGTCTTTGACGCCACCAGTAACCGGCAATGAACAAAAACCGCTTGTCTGGGCTAGTGGGAGAGGAGTAGACAGCAT
 TGACTATTACAAAAAGCTGATCAACAGTCTGTAGCCAACTAGAAGCAGAAACAAAGAAGCGTCTCTGCGGAGAAAGCAGCAAAAC
 GCAGGGTGTGTTCTTCAACGACCGTGTCACTGACGCTCTAGCTGCTCAGTCACTACACTGCCAGATGGTTGATAAATGGAACGG
 TGACCGAAGCTCCCGAGCTCCGACCTCATCTGGGAGAATCTCAAGATCAAGTCTTCCAGCAGAAATAGTCAGACAGTACTTGT
 CTACTTCTGTGOGATAACTATATTGTTCTACATGATCCCTATAGOGTTTGTCTCTGOGATCAACACTCTTGGGAATCTOCAG
 AAGGCTCTTCCCTTCAAAACCGATGTGGGAGATTGCTTTTATAAGAACCCTTGCAGTCTTACCTTCTCAGATTGOGCTCA
 TTGTCTTCTGGOGATGCTTCCAAAGTCTCATGTTCTTATCCAAGTCAGAAGGGATTCTTCCGAGATCATGCTATTAGAGC
 TGOCTCCGGGAAGTACTTTTACTTCTGGTGTGAATGTCTTCACTGGTGTGACACTTGCAGGGTCTTTGTTTGATAACTTGAAG
 GCTCTTGTAGACGAAACCAACTCCATCGTTAACGTTTTGGCTACTAGTCTCCCTAAGAAGGCTACTTTCTTCTTGTACATAAGTTG
 CTCTCAAGTCTTTGTTGGTTATGGTCTTGTAGCTGTCTAGGATCATACCGTTGATAATATTCATTTGAAAAAGAAGTATCTATG
 CAAACTGAAGCCGAGGTCAAAGAAGCTTGGTATCCAGGAGACTTGAAGTACGOGACTAGGGTCTAGGACATGCTCATOCTC
 ACAATCACTTCTGCTACTCCGTAATGCTOCTTTGATOCTGTGTTGGTGTATCTACTTTGGTTTAGGTTGGCTCATOCTAA
 GGAACAGCGGTTGAAAGTGTATGTTCCATCGTACGAGAGCTAAGGGAGGATGTGGCCGCATATTCACACCCGCATACTAGGGC
 GTTGTCTTCTGTTCACTGGTTATGTTGGTACTTGGGAGCCAAAGCTATTGTTGGGGGACTCTTTGGTCTCTCATATTC

ATCTCTCATCTTOGGTTAOGTGTGCOGTCAGAAATCTACAAAGGGTTOGAACACACGGCTCTAGAGGTGGCTTGCOGGGGGC
TGAAGCAGAGACCGGACCTOGAGGAGGTTTTGAGAGOGTACATTCOGCATAGCTTGAGCACTCACAAAGGAGATGATCACCCAGTT
CAAAGGAGCAATGTCTOGTTACCAAGACTATGCTGCTATATCAGCTGCTTAAGATTTGAATOCCTCTOCCACAGATTTGTTTTGTT
TGTTTTTTCTAGAAGCTTTTTTTTTTTTTTAATTATTGTGTGTGATTCTAGAGTTTGTAGGATTTTTGTTTGTATGTG
TTGTTGGTTGTTGTAACCTGTAACCATGTAAGCTAOCCTATTAATTATCAACTTATCAGTGTTOGTCAAAAAAAAAATAAAAAA
AAAAAAAAAACTGAGGCCATAAGGGCC

atggatccatgggaaggcagctccttgacccgaaacccattgacctggatccgcaagct 60
M D P W E G S S L T R N P F A W I R E A
ttcactccaccgaacaagacgtcgtaagctgtccggcgctgataccgccgtctacttc 120
F T S T E Q D V V K L S G V D T A V Y F
gtctcttgagcactgttctgggatattgctttgctggctcttctctcttgccgact 180
V F L S T V L G I F A L S A L L L L P T
ctactcccttatccgctactgacaacagcttaagacctcaaggaacgtcactgacacc 240
L L P L S A T D N S L K T S R N V T D T
acaagtaacggaaccttagccaacttgataatctatctatggctaacaatcactagaagg 300
T S N G T F S Q L D N L S M A N I T R R
agttcaaggctgtgggcttctaggagcggttactgggtatctctagtcacatattc 360
S S R L W A F L G A V Y W V S L V T Y F
atggtatggaaagcttacaagcacgtcgtgcactgagagctgaagctctgatgtctagt 420
M L W K A Y K H V A A L R A E A L M S S
gaagaagtattaccagagcaatacgtattctcgttagggatataccttcccacctaac 480
E E V L P E Q Y A I L V R D I P S P P N
ggagagacgcagaaagagttcgtggattcttacttcagagaaatctaccagagacattc 540
G E T Q K E F V D S Y F R E I Y P E T F
tacagatccctgtcgtaacagaaaacagcaagattaataagatatgggaaaactggaa 600
Y R S L V V T E N S K I N K I W E N L E
ggctacaagaagaagctcgcgcgcgcagaagcggctcttgacgccaccagtaaccggcca 660
G Y K K K L A R A E A V F A A T S N R P
atgaacaaaaccggcttgctcgggctagtgggagagcagtagacagcattgactattac 720
M N K T G L L G L V G E R V D S I D Y Y
acaaagctgatcaacgagctgttagccaaactagaagcagaacaaagaacggttctcgcc 780
T K L I N E S V A K L E A E Q R T V L A
gagaagcagcaaaccgcagcgggtgtgttcttcacggaccgtgtcactgcagctctagct 840
E K Q Q T A A V V F F T D R V T A A L A
gctcagtcactacactgccagatgggtgataaatggacggtgaccgaagctcccagacct 900
A Q S L H C Q M V D K W T V T E A P E P
cgccagctcatctgggagaatctcaagatcaagttctcagcagaatagtcagacagtac 960
R Q L I W E N L K I K F F S R I V R Q Y
ttgatctactcctcgttgcgataactatattgttctacatgatccctatagcgtttgtc 1020
L I Y F L V A I T I L F Y M I P I A F V
tctgcgatcaccactctgggaatctccagaaggctcttcccttcattaaaccgatcgtg 1080
S A I T T L G N L Q K A L P F I K P I V
gagattgctttataagaaccatcttgacgtcttaccttctcagattgcgctcattgtc 1140

M A T V E E K P L M V V G V D E S E Q S
acctacgctttggagtgagcgcctcgatcgcttcttcgctccctacgctcccaatttccg 120
T Y A L E W T L D R F F A P Y A P N F P
ttcaagctcttgatcatccacgccaacctaacgccgtctccgccgttggtttcgctggt 180
F K L L I I H A K P N A V S A V G F A G
cccggaattgtggaggttgtgcctcatgttgatgcagattgaagcataccgctgctaag 240
P G I V E V V P H V D A D L K H T A A K
gttgtcgaaaaggccaaaggaatctgtgagagcaaatacggtcatgacgcgacgatgaa 300
V V E K A K G I C E S K S V H D A T M E
gttttcgaaggcgatgcaaggaatatcctgtgaggttggataaacaccatgcttct 360
V F E G D A R N I L C E V V D K H H A S
cttctgttgggaagccatggtcatggagcaatcaagagggcggttatcgggagcgtg 420
L L V V G S H G H G A I K R A V I G S V
agcgactactgtgccatcatgcgcatgctcggtgatgatcgtaagaagcctaagatc 480
S D Y C A H H A H C S V M I V K K P K I
aagctc 486
K L

>S-29(stem) EU186364

GGCCAAATCGGCCATCACCGAAGATGAOCACCGAGAAGAAAGAGATGGAAGTGGTGAAGGTCTAGACTTGGAGAGGTACATGGG
COGITGGTAOCGAGATTGCTTCTTCCCTTCCAGGTTCCAAOCCAAGAOCGGTGCAGACACTOGGOCACCTACACOCCTTAAOCCO
GACGGCACOGTCAAAGTCTTGAOCGAGAOGTGGGACGGAGGCAAGAGAGGTTTCATCCAAAGGCTCAGCTTTCAAAAOCGATCCTA
AGAGOGATGAGGCCAAGTCAAAGTCAAGTCTAOGTTCCTTCCCTTCCAAATCATTCCOOGTACTGGTGATTACTGGGTGTT
GTACATOGATCCTGAGTACCAGCATGCTGTCATTGGCCAGOCCTTCAAGGAGTTATCTCTGGATCCTGAGCAGGAOCGGOCAGTGTG
GAGGAAGAGACATAACAAGCAGCTGGTGGAGAAGGCGGTGGAGCAAGGGTATGATGTTAGCAAGCTTCCAAAGACAGCTCAGAGTG
ACACACCCACOCGAGTCCGACGCTGCTCCTGACGACACCAAGGGCATTGGTGGCTCAAATCTATCTTCGGCAAATAGTTACCAGA
CACATTAAGACTTGTTCACATCCTTTACTTGTCTGTGTGTAATATACTACACTACOCCTTTTGTTTACTOCAGTAATG
AACGTTCTACTTTTTGTTGGTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGAGGCCATAAGGGCC
atgacgaccgagaagaagagatggaagtggtgaaaggtctagacttggagaggtacatg 60
M T T E K K E M E V V K G L D L E R Y M
ggccggttgtagagattgcttcttccctccaggtccaaccaagaacggtgcagac 120
G R W Y E I A S F P S R F Q P K N G A D
actcgcgccacctacacccttaaccccgacggcaccgtcaaagtcttgaacgagacgtgg 180
T R A T Y T L N P D G T V K V L N E T W
gacggaggcaagagaggttcatccaaggctcagctttcaaacccgatcctaagagcgat 240
D G G K R G F I Q G S A F K T D P K S D
gaggccaagttcaaagtcaggttctacgttcccttcccttccaatcattcccgttact 300
E A K F K V R F Y V P P F L P I I P V T
ggtgattactgggtgtgtacatcgatcctgagtaccagcatgctgtcattggccagcct 360
G D Y W V L Y I D P E Y Q H A V I G Q P
tcaaggagttatctctggatcctgagcaggacggcgcacgtggaggaagagacatacaag 420
S R S Y L W I L S R T A H V E E E T Y K
cagctggtggagaaggcggtggagcaagggtatgatgtagcaagcttcaagacagct 480

Q L V E K A V E Q G Y D V S K L H K T A
cagagtgacacaccacccgagtcgacgctgctcctgacgacaccaagggcatttggtgg 540
Q S D T P P E S D A A P D D T K G I W W
ctcaaatctatcttcggcaaa 561
L K S I F G K

>S-30(leaf) EU186345

GGCCAAATGGGOCATCACGGACAAAACCTTCTAATCTOCTTCAGITTAACACAGAGCTTCTOAAAAATCTTTACAGITTOCAAA
GATCTAAAGAAAGAAGTTTAGTGGATCATGAATTATCTTAAACAAGGTCTGGATGGCAGCATCTTTOGTAGCTGTTCAAGGAAACC
COGATCAOGGGCTCAAGCTGAAAACCGOCTCAGCTCOGCOCCACGGCTTCAACGCOGCTCTTCTOCTOOGATCTOCTOCTCTCTC
CGOOCGAGATGTTCCOCTAGACGATGTTCTCAGAAGAAAGACGACATCTCTCTCTCTCTCTCTOACTOOGGATGAATCT
CTOOGTCAGGTGATGAOCTCAGCTGCTGGAGCOAAGGCTAATTCTAACTOCATGCATTCATCAOCCAGATGATGATGATGATG
ATGATGATGATGCATGGTGACTTTCTCATGGAGCOGCTTACTOOGTCAAAAAGAGTTGGATTGTCTGATGATAAACTGTATAAT
ACTTCAGTGTATATTGTATTATAGTCATCTATGTGAATATTAGACATGTTCAAGAAGATCTAGAGCAAAAGTTGTTTATGAGA
ACTCTGTCTTTTGTTCAGATCAAAACATCGTCTCTCTTCCAAGTTCTCATCAAAACATTATCAAATCTTAAAAAAAAAAAAA
AACATGGGCCATAAGGGCC

atgaattatcttaacaaggtctggatggcagcatcttctgtagctgttcaaggaaacccc 60
M N Y L N K V W M A A S F V A V Q G N P
gatcacggcgtcaagctgaaaaccagcctcagctccgcccaccggcttcaacgcccgtctt 120
D H G V K L K T S L S S A H R L Q R R L
tcctccgatctcctccctctctccgcccagatgttcccgtagacgatgttccctcagaa 180
S S D L L P L S A A D V P V D D V P S E
gaaagacgacatccttcttcttcttcttccactccggatgaatctctccgtcaggctc 240
E R R H P S S S S S S T P D E S L R Q V
atgtacctcagctgctggagccaagggc 267
M Y L S C W S Q G

>S-31(Stem) EU186365

GGCCAAATGGGOCATCACGGAATAGATTAGATTAGATCTTCTTTCOOGATCATOGTCTCTTACOGATTGTTCAATTATOCATOG
TTTGTGATTGAAACAAGGTATCTACGATGAGITTOGAAGAAGGTGGAAGGCTOCTCAGCTOOGGOGAATOGAAGAGACCOGTAOCA
GGTGCTCTCTGTAGCAAGAGACGOCCTGATCAAGAAATCAAATCOGCTTACOGTAAATTAGCTCTCAAGTATCATOOGGATAAG
AACGOGAATAATCCAGAAGCTTCTGATCTTTTCAAGGAGGTTGCTTCTCTTACAGCATCTTGTCTGACCOGGAGAAGAGAAGGC
AATACGACAATGCTGGGTTTGAAGGCTTGTGCTGATGGAATGGAATGGAATOGACTTGTCTAACTTAGGAAGCTGTAACAC
CATGTTTGTGCTGATTGTTGAGCAAACTAGGTGTGCTATCAAGACACTGTGTCTGCOAATGTTCTTGAAGGAGCTATGAATGGA
ACTGTTACTGTTAGGCTCTTCTOCTATTGGTACATCTGTTAGCGGCAAGGTTGAGAAGCAATGOGCTCATTTTTTTGGAGITTACAA
TAAGTGAACAACAAGCTGAGTCAGGGGTTGTTGTTAGAGTGACTTCAACTGCACAAAGTAAATTCAAATTACTTTATTTTGGCA
AGATTCAAGTGGGGCTATGGATTAGCCTTACAGGAAGAGAGTGAGAAAAAGGGAAGGTGACATCAGCOGGCATGATTTCTTA
CATTTTCAAGTTTACAGAATGGATTCAACTGTCAATGCGTTAGCTGCAGCOCAAGGACCOCTGAATCOGCTTTCTTCAAGCGTTTGG
AAGGTCTTCAOCTTGTGAAGTCTCGAACTGAGAGCTGGCACTCATATATTTGCAGTTTACOGGTGATAACTTCTTTAAGACTGC
ATCTTACACAATTGAGGCATTTGTGCAAAAGOCCTATGAGGAGACGACAGAGAAGTTGAAGGAGATTGAAGCTCAAATCTTAAGA
AAGAGAAAAGACTTGGGGCAGTTTGAAGTGAAGTACGAAAAGCTTTGGCTOGCTTTCAAGAAGITTAOCCAGATACAOCCAGG
AGAAGCAAAGTGTGGGTGAGCTGCTAAAGCAACGGGACTOGATTCAATTTGTTTTTTTTGTGGTGAAGAOCCOAGOGGCAACAA
CTTGAGCAOCCGAAGTAGCAGCAAAGCTCAGGGAGATGAOCCAAAAGGAGAGGGTGATAGTGCAGGAGAAGGOGGGGOCAGAG
AGTAGAGACAAATTGAAAAGGAAATGGTTCAACTTGAACATAAAAAGGATTTGATAAGAAGCTTGGTTGACCAGATGGGGGCTTTG
TTCCTTTGTTGGTATTTTAAAGTTTTTTGGGGTTTTTTGTTTCATTOGTTGTTGGGAACTGATACGTTGTCCCTGGTATAAACTGG
TATTATTATCATTGTGOGGTTATATGTTTCAATGGTTCOOGTAAAGCTTTTTTAAATGCAGAAGGATTGTAGTGGTATAGGAA
AGCTTTTCAAGTTGGGATATGCAACTTTGATTTTATTGTAAGTTTTTGAAGTTATAATTTCTGAAAAGATTTTTTTTTTAAAA

AACTGAGGCCATAAGGGCC
atggaaatggaatcgactgtgctaaacttaggaactgtaaacaccatgtttgctgcattg 60
 M E M E I D L S N L G T V N T M F A A L
 ttcagcaaactaggtgtgcctatcaagaccactgtgtctgccaatgttcttgaggaggct 120
 F S K L G V P I K T T V S A N V L E E A
 atgaatggaactgttactgttaggcctcttctattggtacatctgttagcggcaaggtt 180
 M N G T V T V R P L P I G T S V S G K V
 gagaagcaatgcgctcattttttggagttacaataagtgacaacaagctgagtcaggg 240
 E K Q C A H F F G V T I S E Q Q A E S G
 gttgtgttagagtgactcaactgcacaaagtaaattcaaatfactttatgttagcaa 300
 V V V R V T S T A Q S K F K L L Y F E Q
 gattcaagtggcggctatggattagccttacaggaagagagtgagaaaacagggaggtg 360
 D S S G G Y G L A L Q E E S E K T G K V
 acatcagccggcatgtatttctacattttcaagtttacagaatggattcaactgtcaat 420
 T S A G M Y F L H F Q V Y R M D S T V N
 gcgtagctgcagccaaggaccctgaatccgctttctcaagcgtttggaaggcttcaa 480
 A L A A A K D P E S A F F K R L E G L Q
 cctgtgaaagtctcggaactgagagctggcactcatatatttgagtttacggtgataac 540
 P C E V S E L R A G T H I F A V Y G D N
 ttcttaagactgcatcttacacaattgaggcactttgtgcaaagacctatgaggagacg 600
 F F K T A S Y T I E A L C A K T Y E E T
 acagagaagttgaaggagattgaagctcaaatcttaagaaagagaaaacgacttgccgag 660
 T E K L K E I E A Q I L R K R N D L R Q
 tttgaaactgagtaccgaaaagctttggctcgctttcaagaagttaccaccagatacacc 720
 F E T E Y R K A L A R F Q E V T T R Y T
 caggagaagcaaactgtgggtgagctgctaaagcaacgggactcgattcattgttttt 780
 Q E K Q T V G E L L K Q R D S I H L F F
 tttgtggtgaagacccaagcggcaacaacttgagcaacggaagtagcagcaaagctcag 840
 F V V K T P S G N N L S N G S S S K A Q
 ggagatgaacaaaaggagaggggtgatagtgaggagaagaaggcggggcagagagtaga 900
 G D E P K G E G D S A G E E G G A E S R
 gacaaattgaaaaggaaatggttcaactgaacataaaaggatttgataagaagcttgg 960
 D K L K R K W F N L N I K G F D K K L G

>S-34(stem) EU186366

GGCCAAATCGGCCATCAGCACAACATTGTCATTTTCAAAGTCTAAAGCTCTAACATTTTTCTCTOCTOCTTCTCTGTAAATC
 TCOGGAAGAAATGACTTTACAGOCATGAGGAGAGACCATGGAAOCTTCAAGCTATGGTOGGATCOGATCTCAACGAGCTCGC
 TACCGCTGCTAAGAATCTOGCTAATCACACCTAATGCTCACTGGITTAGGCTTTGGTACTTCTATCTOCTOGAATGGATTGCTTCA
 ATOGOOGOCATATACTTGTTGGTCTTGGATOGAACTAACTGGAAGACOAAATATGCTCACATCACTTTTGATTOCTTACATCTTCT
 TCAGTCTTCTTCTGTGATCTTTGGCCTTTTCAGAGGAGATGTGGTAAATGGATOGCGTTTGTAGCTGTTGTTGTAACTCTT
 CTTOCTAAACACTTTOGAGAATGGTTGAATTACCGGOGGCTCTGATTCTACTCATOGTGGTGGCTCOGGGGCTCATOGCOGGC
 ACATTAGAGACAACCTGGGTTGGTTAGTOGTATGCTTATTGATOGGATGTTACTTGTCTCAAGAACATATTAGAGCTTCAGGTG
 GATTTAGAAAACGGTTACAAAAGCTCATGGCATCTCOAACACTCTGGGATCATAGCTCTOGTGTCTTTTCCATTTGGGCTCT
 TGCTTTTAAAGACAACCTCTCTGTTTGAATTTGATTTATGTAATATTGTGATTTGTATGATTCTCTGTCTCTCATAA

CTTGTCAACCAATGTGTTTTAGITTTCTAOCCTCTTGAOCTATCCAATAGACATCAGGGGTTTGTGTGTGAAAAAAAAAAAACTG
 AGGCCATAAGGGCC
 atgactttcacagccatgaggagagaccatggaacccttcaagctatggtcggatccgat 60
 M T F T A M R R D H G T L Q A M V G S D
 ctcaacgagctcgctaccgctgctaagaatctcgctaatacacaccttaatgctcactggt 120
 L N E L A T A A K N L A N H T L M L T G
 ttaggccttggacttctatcctcgaatggattgcttcaatcgccgcatataacttgttg 180
 L G F G T S I L E W I A S I A A I Y L L
 gtcttggatcgaactaactggaagacgaatgctcacatcacttttgattccttacatc 240
 V L D R T N W K T N M L T S L L I P Y I
 ttcttcagcttctcctctgtgatcttggcctttcagaggagatgtcggtaaattggatc 300
 F F S L P S V I F G L F R G D V G K W I
 gcgttttagctgttgtgtacaactcttctccctaaacactttcgagaatggttgaa 360
 A F V A V V V Q L F F P K H F R E W F E
 ttaccggcggctctgattctactcatcgtgggtggctccggggctcatcgccggcacattt 420
 L P A A L I L L I V V A P G L I A G T F
 agagacaactgggttgggttagtcgtagcttattgatcggatgttacttgctccaagaa 480
 R D N W V G L V V C L L I G C Y L L Q E
 catattagagcttcaggtggatttagaaaacgcggtcacaaaagctcatggcatctccaac 540
 H I R A S G G F R N A F T K A H G I S N
 actcttgggatcatagctctcgtcgtctttcccatttgggctcttgccttt 591
 T L G I I A L V V F P I W A L A F

>S-37(Flower) EU186330

GGCCAAATCGGCCATCACGGGAATTCAAAACCCAAAACATAAACCATAAAAAATAAAACATTAATACCCACAAAAACACATATG
 CGAGGGGTTAAACTATTGGCOGOGTGOCTCTAOCCTGGCOGCGAOCGCAACGGTGGTGGTGCATGCOGAAGACOCCTACTTCCACC
 AOGTATGGAACGTGAOCTATGGAACOCCTTCTOCTCTAGGCGTTCACAACAAGTCATTCTAATCAACGGCOCAATTCOCTGGTCC
 CAACATCAACTCAOCTCAACAACAATGTCATCATCAAGTCTTCAACAACCTTGATGAACOCCTTCTOCTCCTACTTGGAAATGGA
 ATOCAGCACAGGAAGAACTGTTGGCAAGATGGGACTOCAGGGACTATGTGTGOGATCATGCOOOGCAOCCAACTACACTTAOCATT
 TOCAGOCFAAGATCAGATAGGAAGCTACTTCTACTATOCACACAGGGATGCAOOGTGOOGCTGGTGGATATGGTGGACTOOG
 AGTGAACAGCOGCTCTOCTCATOOCGGTCCOCTTAOCCTGATOCOOGAAGATGACTTACTGTCTCATCGGTGACTGGTACTACTAAG
 AGCCACTCAGTTGAAGAAGTTCOCTGCAOOGTGGTGGTACTATTGGTGGTGCAGACGGTATTGTATCAACGGAAAGTCCGGAA
 AAGGTGATGGATCAGACGCACOCGCTCTTCAOCTTGAAGOCCTGAAAGACTTACAGGGTTAGGATCTGTAAGTGGGTCTCAGACAT
 CTATCACTTTAGGATTCAGAATCACAAGATGAAGCTOGTTGAATGGAAGGATOGCAOGTCTTCAAACGATTACGACTCTCTOGA
 CGTTCAOGTTGGOCAGTGCCTTTGGCACATOGTTAOCGOGAATCAAGAAOCTAAAGATTACTACATGGTTGCATCCTCTAGGTTCT
 TGAAGAOGGTTATTACAACAACOGGACTTCTOOGCTAOCAGGGGAGGCAAGGAOCCAGOCCTTTCACAGCTOOCGGCTGGTCCGGT
 CGGATGGGOCCTGGTGGTGAOCCAGTTCOOGATCCTCAGGTGGAACCTTGAOCGCTAGTGCAGOCAGGOCCTAACOCCTCAGGGATCT
 TACCATTATGGAAGATCAACATCAACOGTACAATCAAGCTOGTGAACACTCAAGGCAAGGTGATGGTAAAGCTTAAAGTTTGCAT
 TGAOCGGAGTCTOCCACACAGAAOCTGAGACOOCTCTGAAGCTGGCOGAATACTTTGGTATTTCCGACAAGGTGTTTAAAGTATGA
 TACCATCACOGATGAOCCAAOCCCTGAACAGATCAAGAACATCAAGATOGAGOCCTAACGTTCTTAACATCACTCAOCCGACOCCTTC
 GTOGAGGTGGTGTTTGAGAACAACGAGAAGAGTGTTCAGTCTTGGCACTTGGAOGGTATTCTTTCTTCTOOGTTGCTGTTGAGC
 CAGGGACTTGGAOCCAGAGAAGAGGAAGAACTACAACCTCTTGGATGCAGTGAGCAGACACACAGTTCAAGTCTAOCCAAAGTG
 TTGGGACGAATCTTGTCTCACATTTGATAACTGOGGAATGTGGAOCGTTGGTCTGAGAACACAGAGAGAOGTTACTTAGGACAG
 CAGCTTAAOCOCAGTGTCTTGTCTOCAGAGAATCACTTAGAGATGAATACAACATGOCTGAGACAAGCCTOCAATGTGGTCTCG
 TCAAAAAACACACCTAAACCTGTTAACOCCTAOCGCTGGTGOCTAAGTTAACTTTAAATACAACCTAAAGAGTTTTGATTCTTCTGT
 TGATCTGAAAATTAATTTCTAAAATTATATGGTTTACTOGTATATACATGGAATTGAAAATGTATGTATGTCTATAOCTTTTA

AGTAATTTTCTTTCTTTCAAGAAGCATTAGTCTTCTCTTTGTTTTTGTTCCTTCACTTTTTTGTAAACAATTATGTAATGTATTA
 TGTATOCATAATCTTCOGATGAAATAAGCAAAAAGAGATCTTATTTCTOCCAAAAAAAAAAAAAAAAAATACGGGCCATAAGGGGC
atgcgagggggttaaactattggccgcgtgcctctacctggccgcagccgcaacggtggtg 60
 M R G V K L L A A C L Y L A A A A T V V
 gtccatgccgaagacccttacttccaccacgtatggaacgtgacctatggaaccgcttct 120
 V H A E D P Y F H H V W N V T Y G T A S
 cctctaggcggtccacaacaagtcatctaatcaacggccaattccctggtcccaacatc 180
 P L G V P Q Q V I L I N G Q F P G P N I
 aactcaacctccaacaacaatgtcatcatcaacgtcttcaacaacctgatgaacccttc 240
 N S T S N N N V I I N V F N N L D E P F
 ctctcacttgggaatggaatccagcacaggaagaactggtggcaagatgggactccaggg 300
 L L T W N G I Q H R K N C W Q D G T P G
 actatgtgtccgatcatgcccggcaccaactacacttaccatttccagcctaaagatcag 360
 T M C P I M P G T N Y T Y H F Q P K D Q
 ataggaagctacttctactatcccaccacagggatgcaccgtgccgctggtggatggt 420
 I G S Y F Y Y P T T G M H R A A G G Y G
 ggactccgagtgaaacagccgtctcctcatcccggctccctacgctgatcccgaagatgac 480
 G L R V N S R L L I P V P Y A D P E D D
 taaactgtcctcatcggtgactggtacactaagagccacactcagttgaagaagttcctc 540
 Y T V L I G D W Y T K S H T Q L K K F L
 gacggtggtcgtactattggtcgtccagacggtattgtcatcaacggaaagtccggaaaa 600
 D G G R T I G R P D G I V I N G K S G K
 ggtgatggatcagacgcaccgctcttcaccttgaagcctgaaagacttacagggtagga 660
 G D G S D A P L F T L K P E R L T G L G
 tctgtaacgtgggtctcagacatctatcactttaggattcagaatcacaagatgaagctc 720
 S V T W V S D I Y H F R I Q N H K M K L
 gttgaatggaaggatcgcacgttcttcaaacgattacgactctctcgacgttcacgttgg 780
 V E W K D R T F F K R L R L S R R S R W
 ccagtgctttggcacatcggtaccgcaatcaagaacctaaagattactacatggttgca 840
 P V L W H I V T A N Q E P K D Y Y M V A
 tcctctagggttctgaagacggttattacaacaaccggacttctccgctacgagggagggc 900
 S S R F L K T V I T T T G L L R Y E G G
 aaaggaccagcctcttcacagctcccggctggtccggtcggatgggcctggtcgttgaac 960
 K G P A S S Q L P A G P V G W A W S L N
 cagttccgatccttcaggtggaacttgaccgctagtgcagccaggcctaaccctcagggga 1020
 Q F R S F R W N L T A S A A R P N P Q G
 tcttaccattatggaaagatcaacatcacacgtacaatcaagctcgtgaacactcaagggc 1080
 S Y H Y G K I N I T R T I K L V N T Q G
 aaggtcgtatggtaagcttaggtttgcattgaacggagtctcccacacagaacctgagacc 1140
 K V D G K L R F A L N G V S H T E P E T
 cctctgaagctggccgaataactttggtatttccgacaaggtgtttaagtatgataccatc 1200
 P L K L A E Y F G I S D K V F K Y D T I

accgatgacccaaccctgaacagatcaagaacatcaagatcgagcctaacgttcttaac 1260
 T D D P T P E Q I K N I K I E P N V L N
 atcactcaccgcaccttcgctcgagggtgttggagaaccacgagaagagtggtcagtct 1320
 I T H R T F V E V V F E N H E K S V Q S
 tggcacttggacgggtattcttctctccgttgctgttgagccagggacttggacccca 1380
 W H L D G Y S F F S V A V E P G T W T P
 gagaagaggaagaactacaacctcttggatgcagtgagcagacacacagttcaagtctac 1440
 E K R K N Y N L L D A V S R H T V Q V Y
 ccaaagtgttggcgagcaatcttgcacatttgataactgcggaatgtggaacgttctgt 1500
 P K C W A A I L L T F D N C G M W N V R
 tctgagaacacagagagacgttacttaggacagcagctttacgccagtgcttcttcca 1560
 S E N T E R R Y L G Q Q L Y A S V L S P
 gagaaatcacttagagatgaataacaacatgcctgagacaagcctccaatgtgggtctcgtc 1620
 E K S L R D E Y N M P E T S L Q C G L V
 aaaaacacacctaaacctgttaacccttacgctgggtgcc 1659
 K N T P K P V N P Y A G A

>S-39(Leaf) EU186346

GGCCAAATGGGOCATCACGGCTCATOOCTOOCTCACATATCGAAAAAATCAGTGAGATATGGAGCTOGATTCAOCCOOGCT
AGAOGCAGACTOGCOOOGTGOOOGCTCACTTGOOGCTAGCOAOCAAAGATCOOGTCTOCCOOGCATOGCTOGITTOOCTTGA
GTAGOGGTAGTTTGAACCTCTGTTATCAGAAGATGTGACAACAACCTCTCTTTTGCOOOGCOAAGCATCTTTOGAGCAGGGCTTTTT
CATGAAGCAGGCTTGOOCTGAOGAGACTGGCACTGGGGGGGGCATCACTTTGAAGAAGCTCTGTGTTAGAAGATGTGACAACAGG
CTGTATTTTCTAGGCAAGCATCTTCTGCACAGGGTCTTTTCATGAGGCAGGCTTCAACTGATGAGGAGCTGCATCTACCAAGT
ACTCTGGACCAAAAAGGAATTGCTTGOCTTCTTCAACAACCAOCCATTGCTTTCTAGAOCTGAGTAOCCOCCOCCACAGTTTTOCAA
GGOOOOGCAAAAGATGAGTTCCTTTGTTGTTCTGATTCAOCCATATCATCAAAAGGAAGACGGCTTGGAAAAGOCATACAATOCT
GATCTTGOCTAAGTTAGCOAATCTAGGGACTGTTTGGTCTOOGAGATCTAATGTGOCAGAGTAOAAAAATAACTACCTTGTGGCAG
TAGAGCTAOCAGGGGGTAGTATCAATGATATAAGAGTTGAGGTTGGCAACACAACTTGACTGTGACAGGTAGACGCACATTTGT
TTGTCAAAAAGTTGATACGTGCOOCCAAAGGTTCAAGTTTTGGATATCAGAAGCAAGAAATCTTCAAGGGCOOCTTCAAAGTTTTC
TGGCOOCTOCTAGCAAAGTGAACAAGGATAACGTTGCTGCTGAATTTATGGATGGGATTTTGGAGTAGGGATCOAAAGATT
GAAGGTTTCATGTTTTGGAACATATACAAAACAGTAAATAAAGGGTATAATTTATGCTGTTTGGGGGAAGAAGGGAAAGAAAA
GCCTAAAATGATGAAAGATATGAAAATAGTTTGGTTTTTATTTTTCATAGATTGCAGACAGGCATGCTCAGTTGATAGAGTA
AGCOAAGTAAACAATCOCTTAATATAAGAACAATAAAGCTTGGTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
GCATGGGCCATAAAGGGCC

atggagctcgattcaaccaccgctagacgcagactcgccaccgtcgccgctcacttcccg 60
 M E L D S T T A R R R L A T V A A H F P
 ctagccaccaagatcccgtctccaccgcatcgctcgttcccttgaactgtagcggtagt 120
 L A T K D P V S T A S L V P L N C S G S
 ttgaactctgttatcagaagatgtgacaacaaactctcttttggccgccaagcatctcc 180
 L N S V I R R C D N K L S F A R Q A S S
 gagcagggcttttcatgaagcaggctcccctgacgagactggcactggcggcggcatc 240
 E Q G F F M K Q A S P D E T G T G G G I
 actttgaagaactctgtcgttagaagatgtgacaacaggctgtatttcttaggcaagca 300
 T L K N S V V R R C D N R L Y F A R Q A
 tctctgcacagggcttttcatgaggcaggcttcaactgatgaggacgctgcatctacc 360
 S S A Q G L F M R Q A S T D E D A A S T

aagtactctgacgacaaaacgaattgcttcccttcttcacaacaaccattgctttctaga 420
K Y S A T K T N C F P S S Q Q P L L S R
cctgagtagcggccaccacagttttccaaggccgcccgaagatgagttctttgtttgt 480
P E Y A P P Q F S K A A A K D E F F V C
tctgattcaccatatcatcaaaaggaagacggccttgaaaagccatacaatcctgatctt 540
S D S P Y H Q K E D G L E K P Y N P D L
cctaagtagccaatctagggactgtttggctccgagatctaattgctgcagagtagcaa 600
P K L A N L G T V W S P R S N V A E Y E
aataactacctgtggcagtagagctaccaggggtagtatcaatgatataagagttgag 660
N N Y L V A V E L P G G S I N D I R V E
gttggcaacacaaactgactgtgacaggtagacgcacattgtttgtcaaaaagttgat 720
V G N T N L T V T G R R T F V C Q K V D
acgtgccccaaagggtcagttttggatatcagaagcaagaaattctcaagggcccttc 780
T C P K G S V F G Y Q K Q E I L Q G P F
aaagtttctggcccctccctagcaaagtgaacaaggataacgttgctgctgaatttatg 840
K V F W P L P S K V N K D N V A A E F M
gatgggattttgggagtagggattccaaagatt 873
D G I L G V G I P K I

>S-40(Stem) EU186346

GGCCAAATGGCCATCACGCAAGAATAAGAAAGGTAGAAGAGGGCAAAGGACATGGAAGAGAGTCAACAGAGGATCATCTTCAACACC
ACAATCTOGAAGAATCATGGTGATTGOOGAOCOAACOOOGTGAATCOGCAGCTGCTCTTCAATAOCTCTTTACATGOOGTGCCT
GAGCAAGACGAGCTTATCCTOCTGTCATGTTGAAAAAATGGTGGCTCATGGAAAAATGCTTTCTOCCAGTTTTTGTAGATTACCAA
GCTOCAGCTOCTOCTCAAACACCAGOGGGTCTTACCAGGAGCTGCTAATTTTAATCCTAGCACAGCAAACCTGGCTTCATCTTT
GGOCTCAGAAATTGGTCAGGGAGAAGGAAATTTTCTTGAACAGATGAGACGTATATGTGAAGTGGCTCAGCOCAAAGGTACCTGTT
CACACOGAGTGTATAAOCATGGAAGGCATCAAAGCTGCAGCTATTCTTCTCACGGAGAGAACTTGGGGTGTATGTTATAATCA
TTGGTCAGOGGAGGACAATCTCATOCTOCTTCTAGGATCTAGGOGACCTGGAGGGTCTCTAAGAGGGTCAAAGGAGTAGACAC
AGOGGAATATCTAATOGAGAATAGCAAATGCACATGTGTTGGTGTGCAGAAGAAAGGTCAAATGGAGGGTATGTTCTAAACACC
AAGACCCACAAGAACTTTTGGCTCTTGGGTGATCATGCTCAATGCTOCTAGTCAGTTTCATAATTCATAAATGTAGCTAAAAAG
GAAATTATTAATAAATTAOCTGTCATCTTCACTTGGCTTGTTCATGATCTCTAATTCAGTAGATGAAGTGTATGGAGGCCAAACA
TAAATGAACTATTTATTTTACCAGGTTTCATGTTAGCCAGATTGTGTACACCCAAAAAATGAACTGAGGGCCATAAGGGGCC
atggaagagagtcacagaggatcatcttcaacaccacaatctcgaagaatcatgggtgatt 60
M E E S H R G S S S T P Q S R R I M V I
gccgaccaacccgtaatccgcagctgctcttcaatagctctttcacatgccgtgctt 120
A D P T R E S A A A L Q Y A L S H A V L
gagcaagacgagcttatcctcgtccatgttgaaaacaatgggtggctcatggaaaaatgct 180
E Q D E L I L V H V E N N G G S W K N A
ttctcagtttttgagattaccaagctccagctcctcctcaaacaccagcgggtcttca 240
F S S F L R L P S S S S S S N T S G S S
ccaggagctgctaatttaatcctagcacagcaaaactcggcttcatctttggcctcagaa 300
P G A A N F N P S T A N S A S S L A S E
attggtcagggagaaggaaatcttgaacagatgagacgtatatgtgaagtcgctcag 360
I G Q G E G N F L E Q M R R I C E V A Q
ccaaaggtacctgttcaaccgagtgataaccatggaaggcatcaaagctgcagctatt 420
P K V P V H T E C I T M E G I K A A A I

cttcttcacggagagaaaacttgggggtgatgttataatcattggtcagcggaggacaatc 480
L L H G E K L G V D V I I I G Q R R T I
tcatcctcccttctaggatctagggcagcctggaggggtctctaagaggggtcaaaaggagta 540
S S S L L G S R R P G G S L R G S K G V
gacacagcggaaatatctaatcgagaatagcaaatgcacatgtgttggtgtgcagaagaaa 600
D T A E Y L I E N S K C T C V G V Q K K
ggcaaaatggaggggtatgttctaaacaccaagaccacaagaacttttggctcttggcg 660
G Q N G G Y V L N T K T H K N F W L L A

>S-42 (Flower) EU186331

GGCCAAATCGGCCATCACGGTGCAGCATCTOCAGAGCTTCTAAOCTCOGGTGGGTTGGGOCTGGTCACTAAAOCAATTCOGAT
CATTGAGATGGAAOCTAAOOGCOAAGTGCAGCTAGACCAAAOCTCAAGGCTCATAOCCACTATGGTAAAATCAACATCCACACGG
TCCATAAAACTAGTCAACACCGTAGGGAAAATAGAGGAAAAGAAGCTCAGGTACGGCTTAGOGGAGTGTACACAGTGGAAACCG
AAACGCOGATTAAGCTGGCTCAGTATTTGGTGTAGOOGACAAGGTGTTCAAGTAOGATACTATTAAGGACGAGOOGACCAAGGT
TGACACTAGTAATATTTGGTGCAGOCAAAAGTTTTGAACATOGAGCACCGTTTCATTGTTGGAGATTGTGTTGAAAATCAGGAA
AGGACTACACAGTCTTGGCATCTTGATGGATACTCTTTCTTTGCTGTGOGGGTTGAGOCAGGGAAGTGGACGCOGGCOGAAGAGGA
AGAACTATAATTTATTAGACGAGTATACOGACACACAATCOAAGTTTATCOCAAATGTTGGGGAGOCATCTTATTGACTTTOGA
CAACTGTGGCATGTGGAATATTCGGTTTGAGATTCTOGAGAAAAGTTACTTAGGTCAACAGCTTTATGTTAATGTGGCOOOGCOA
GAACTATCOOCAGAGGGATGAGTACAGCTTTCAGCAAAACGGTTTTCCGTTGTGGCATTATCCAGGGCTTGOCTGATCCTCAGOCTC
CCAGAGACTCGCTTAAATTTGGTTTGGCGTGGTTCCAGOCTGGAGACTTGTAGCTCAAGGTTTTTACATTTTATATAOCTATGT
OCTTAAAATTTGGTTCTGTAGGTGATGGTGAAGTGTTATGAGATGTCTGTAATOCATTACAGTTTTATGATGCATGCTATTT
TTTTGATTTGTTAAGOCAGACGTTGOGCTGAATTCGAATATAGAAGTGATATGCTTTTGAAGCATGGAAAAAAAAAAAAAAAAAT
ACGGGCCATAAGGG

atggaacctaaccgccaagtgcagctagaccaaaccctcaaggctcataccactatggta 60
M E P N R Q V Q L D Q T L K A H T T M V
aatcaacatccacacgggtccataaaactagtcaacaccgtagggaaaatagagggaaaag 120
K S T S T R S I K L V N T V G K I E G K
aagctcaggtacgcgcttagcggaggtgtcacacgtggaaccgaaacgccgattaagctg 180
K L R Y A L S G V S H V E T E T P I K L
gctcagtatTTTTGGTGTAGCCGACAAGGTGTTCAAGTACGATACTATTAAGGACGAGCCG 240
A Q Y F G V A D K V F K Y D T I K D E P
accaaggttgacactagtaataTTTTGGTGCAGCCAAACGTTTTGAACATCGAGCACCCT 300
T K V D T S N I L V Q P N V L N I E H R
tcattcgtggagattgtgttcgaaaatcaggaaaggactacacagtccttggcatcttgat 360
S F V E I V F E N Q E R T T Q S W H L D
ggatactcttcttctgtgtcgcgggttagccagggaaagtggacgccggcgaagaggaag 420
G Y S F F A V A V E P G K W T P A K R K
aactataatttattagacgcagtataccgacacacaatccaagtttatcccaaatgttgg 480
N Y N L L D A V Y R H T I Q V Y P K C W
ggagccatcttattgactttcgacaactgtggcatgtggaatattcggtttgagattctc 540
G A I L L T F D N C G M W N I R F E I L
gagaaacgttacttaggtcaacagctttatgttaatgtcggccccgaccagaactatcccag 600
E K R Y L G Q Q L Y V N V G P P E L S Q
agggatgagtacagctttccagcaaacggtttccggttggcattatccagggcttgctc 660

R D E Y S F P A N G F R C G I I Q G L P
gatcctcagcctcccagagactcgctt 687
D P Q P P R D S L

>S-44(Stem) EU186368

GGCCAAATCGGCCATCACGACTTTTCTCTGTCCACTCAAGTGTTCCTTGATCTATTAACCCAGAAATCAAGAACTGTCTGTGGA
AAAAAGAGAAGAAGATGAAAATACAGTGTGATGTGTGTGAGAATGCTCCAGCCAGGGTATATGTTGCGCGAOCGAAGCAGCTC
TGTGTCTAAATGCGAGCTTGAGATTCACGCAGCTAAACAACTGCGAGCAAGCAACCAAGCCTCCATCTCAACTCTCTCTCCAC
CAAGTTCCTCGCTGCGACATCTGCCAAGAGAAGGCAGCTTTTATATTCTGTGTGGAGGATAGAGCTCTGCTTTGTAGAGATTGT
GATGAATOCATCOAGTGGCTAACTCTAGATCTGCAATCACCAGAGGTTCTTAGCCACTGGGATCAAAGTGGCTCTCAGCTCAA
GTAGTTGCAGTAAAGAAACAGACAAGAATCATCAGTOCGAGCCTTCCAAACAACAGAAAGCTAAGGAGATCCAAAGCCAGCA
ACAGOOGTCTTCTGCTTCTCCTCTCCTCTGGGCTGTTGATGATTTCTCCACTTCTCTGATCTGAGTTCACAGATAAGAAAGGA
CAGCTTGATCTTGGGGAGTTAGAGTGGTTTTTCAGACATGGGTTTTCTCAGTGATCAGATTAATCAGGAGACTCTTCTGCGACTC
AAGTTCGGAGCTTTCTGTTGCTCATTAGGTCATGTTTCATTACACAGCCAATGAAGTCTAACGCTTCTTACAAGAAGCOGAG
GTTAGAGATCAGAGTTGATGATGAGGATGATGAAGAAGAGCATTTCATTGTCCCTGATCTAGGCTAAAAGATATTATATGTAAGC
TATGTGTAGTAGACATTOCTAGAAOCTATCTGCATATGGAGAATGATGCGTGGAGTCAAATGTCATATCTATAGITTCGTCTAT
AAGTTGAGTAAGCTATGTCTGAGAGAGCTTATTACACACTTTTGGTTTTTTGTCTGAATCTATGTTAGATGTTTGTGTTGAG
TTTGTTCATATAOCTCTTGAACATGGTATTTGATCTCTTTGGTATTACAACTCGACTAACTTAACTAAAAGGAATATCCTTCT
GTTAGGAAAAACA AAAAGGAAGGGAAAAACTGAGGCCATAAGGGCC

atgaaaatacagtgatgtgtgtgagaatgctccagccacggatgatattgttgcgcccagc 60
M K I Q C D V C E N A P A T V I C C A D
gaagcagctctgtgtcctaaatgcgacggtgagattcacgcagctaacaactcgcgagc 120
E A A L C P K C D V E I H A A N K L A S
aagcaccacgcctccatctcaactctctccaccaagttccctcgctgcgacatctgc 180
K H Q R L H L N S L S T K F P R C D I C
caagagaaggcagcttttatattctgtgtggaggatagagctctgcttttagagattgt 240
Q E K A A F I F C V E D R A L L C R D C
gatgaatccatccacgtggcctaactctagatctgcaaatcaccagaggttcttagccact 300
D E S I H V A N S R S A N H Q R F L A T
gggatcaaagtggctctcagctcaagtagttgcagtaaagaacagacaagaatcatcag 360
G I K V A L S S S S C S K E T D K N H Q
tccgagcctccaacaaccaacagaaagctaaggagatcccaagccagcaacagccgtct 420
S E P S N N Q Q K A K E I P S Q Q Q P S
tctgcttctcctctccttgggctggtgatgattcttccacttctctgatcctgagttc 480
S A S P L P W A V D D F F H F S D P E F
acagataagaaaggacagcttgatcttggggagtttagagtggttttcagacatgggtttc 540
T D K K G Q L D L G E L E W F S D M G F
ttcagtgatcagattaatcaggagactcttctcgcagctcaagttccggagctttctgtt 600
F S D Q I N Q E T L P A A Q V P E L S V
gctcatttaggtcatgttcattacacagaccaatgaagtctaacgcttcttacaagaag 660
A H L G H V H S Y R P M K S N A S Y K K
ccgaggttagagatcagagttgatgatgaggatgatgaagaagagcatttcattgtccct 720
P R L E I R V D D E D D E E E H F I V P
gatctaggc 729

D L G

>S-45(Leaf) EU186347

GGCCAAATGGGOCATCACAAAGAAACAACACTAACTCAGCTTCTTCTCTAGCAATGGAAGGAAGTGTCTTCTCOGAGGGCAACC
TCTAACACAGTAOCCCTOCCCTOCCAGACAAAGGTTCTTCTCOAAGGATGGAAGAACAATOGGATTGTCAGGTTTTCTGGTTTG
AAGAATCACTGGATTCTATAAAGTCCAGGCTTTCTTCTGATCTTAGOCTCAGAGCTTCAGACAAAGGTOCCATAAAGGCAAGCT
CTGCOOGTAACTGATGCAAGCCCCAOGAACTCAGAATCCAAAGAACAGAOCCTTGTCTTTGTAGCTGGTGCTACOCGGTAAAGTTGG
TTCTAGGACTGTAAGAGAGCTACTGAAGCTCGGATTOCGAGTAAGAGCTGGAGTTGGAAGCGCTCAGAGAGCAAAAGGCTTGTG
CAGAGTGTTAAGGATATGAACACAGATGAAGGAACCTCAOCTGTAGAAAAGCTTGAAGTTGTGGAATGTGACTTGGAGAAGAAAG
ACTCAATACAGCTGCTTTGGGGAATGCATCTGTGGTTATATGCTGCATTGGTGTCTAGOGAGAAAAGAAATATCOGATATCACOOG
COCTTACAGGATTGATTACTTAGOCCOCAAAGGCTTGTGATGCTGCAACATCTGCAAAAGTTAATAACTTCATCTTGGTGACA
TOCTTGGGGAOCCAATAAATTTGGATTCCOCTGCTGOCATTCTCAATTTATCTGGGGAGTTCTTTGCTGGAAGAGAAAAGCTGAAG
AAGOCCTGATTGCAAGOGGCOCTCAATTAOCCAATAGTTAGGCOCTGGAGGAATGGAGAGACCAACTGATGCATACAAGGAGACTCA
TAATCTGACTCTTGCTCTAGATGATACATTGTTTGGTGGTCAGGCTCTAATCTOCAGGTTGCAGAATTGCTAGCTTGTATGGCT
AAGAAOCCCAACTTTCTTCTGCTAAGATTGTGGAAGTGGTTGCTGAAACAACCTGCACCATTAAOCCOCTATTGAAAAGCTTCTTA
AAAAGATTCCOCTTAAAAAGTCTTATGTGCTOCCAAAGGAATCAGTTCCAGOCAAAGAGGTAACACCAGTTCTGCTGAGOC
TGTCAGCAAGAATCAGTTGCAGOCAAAGAGGTAACACCAGTCTTACTGAGOCCTGTCACTAAAGAAOCCAACAGCTOCCAAGGAG
GATAAAGCAOCTGCAGAAGTGAAGATGTTAAGOCTAGGCOGCTGTCTOCTTATGCOGCOCTATGAAGACTTGAACCTOCCAACAT
CTOCTATTCCGGCCACAGCACCTTGGTGCACCAAGCTAAGGAGGTGGATGCAACTCOGGTTCCGGAGGTGGAAGAAACTCAGGC
TOCTGTTGAGGCTAATGCAGTTCCACCACCAGAAAGTCTGTTGAGACOCAGTGTCCAGTAGTAGAAGAAGTGAAGCAAGTTGAG
GAAAAGAAAGAGAGGCOCTCTTCTOCTTATGCTAGCTATGAGAATCTAAAACCAOCTTCATCTOCCACTOCTAAAGCTTCTGGTA
TOCAGAAGAGOGATACTTTGGGCOCTGTTCCAACAGATTCTGACACTGGTGAAAGCTCAACAGTTGCAACAACCTGTCACTGAGGA
GGCAGAAGCACOCCOCCAGOCATAOCCAAAATGAGAOCTCTTTCTOCTTATGCAGCTTAOGCAGAOCTGAAOCCOCCAOCTCACCC
ACTOCTGCATCAOCCGGTCCOCCAGAAAACAGCAOCTGCAGAAGAAATCTCAGAGTTGOCTGGAGGGAATGATGTGCTGCAAAOCCG
TTGATGGTAGTGTGATCAGACTGAATCTGCTTCTGTGOCAGAGACAGAAACTGTTAACAGTGTGACAGACACTTCCOCTTACACC
AGAAGAAAGTGCAGCTGATCAGCCAAAACCAAGGCCATTGTCAOCTTACACAATGTGAGATAGAGAAAGAGGCATTTTGAAGTA
TGAGGACATGAAGCTOCCAACATCAOCTCTTCCATCTOCCGTCATCAATCATTAGTTATGTGTGAAATGATTTGOGCTTAAOCC
TGGAGCTTCTTCTTTTTAGCTOCAGCTTCTTTTTTACAAATGAGAGAAAGATGGGGAATTCAGTTTACAGGTATGAAT
CAGTGAGCTGAGTAATAACAAGATTCATCTTGOCTTCTGACTTCTTGGTTTTCTTCTGTTCAATACTCATATTGATAOCCCAT
TCTCATTCAAACAACCTTGATAATATATATTTCTGAGTCCATGTTTTCTTATAATATGTTCCOCTATTATTATAAAAAAAAAAAAAA
ACATGGGCCATAAGGGCC

atggaaggaactagttttctccgagggcaacctctaacaacagtaccctccctcccaga 60
M E G T S F L R G Q P L T T V P S L P R
caaaggttccttctccaaggatggaagaacaatcggattgtcaggttttctggttgaa 120
Q R F L L Q G W K N N R I V R F S G L K
aatcactcggattctataaagtccaggtctttctcgatcttagcctcagagcttcagac 180
N H S D S I K S R S F F D L S L R A S D
aaaggtcccataaaggcaagctctgccgtaactgatgcaagccccacgaactcagaatcc 240
K G P I K A S S A V T D A S P T N S E S
aaggaacaagacctgtctttgtagctgggtgctaccggtaaagttggttctaggactgta 300
K E Q D L V F V A G A T G K V G S R T V
agagagctactgaagctcggattccgagtaagagctggagttcgaagcgctcagagagca 360
R E L L K L G F R V R A G V R S A Q R A
aaaggtcttgtgcagagtgttaaggatataaacacagatgaaggaactcaacctgtagaa 420
K G L V Q S V K D M N T D E G T Q P V E
aagcttgaagttgtggaatgtgacttggagaagaaagactcaatacagcctgctttgggg 480
K L E V V E C D L E K K D S I Q P A L G

aatgcatctgtggttatatgctgcattggtgctagcgagaaagaaatatccgatatcacc 540
N A S V V I C C I G A S E K E I S D I T
ggcccttacaggattgacttagccacaaaaaccttgttgatgctgcaacatctgca 600
G P Y R I D Y L A T K N L V D A A T S A
aaagttaataacttcatcttgggtgacatccttggggaccaataaattggattccctgct 660
K V N N F I L V T S L G T N K F G F P A
gccattctcaatttattctggggagtcttggctggaagagaaaagctgaagaagccttg 720
A I L N L F W G V L C W K R K A E E A L
attgcaagcggcctcaattacgcaatagttaggcctggaggaatggagagaccaactgat 780
I A S G L N Y A I V R P G G M E R P T D
gcatacaaggagactcataatctgactcttggctctagatgatacattgtttgggtggcag 840
A Y K E T H N L T L A L D D T L F G G Q
gtctctaattctccagggtgcagaattgctagcttgtatggctaagaaccctcaacttct 900
V S N L Q V A E L L A C M A K N P Q L S
tgctctaagattgtggaagtgggtgctgaaacaactgcaccattaaccctattgaaaag 960
C S K I V E V V A E T T A P L T P I E K
cttcttaaaaagattccttccaaacgtccttatgtgcctccaccaaaggaatcagttcca 1020
L L K K I P S K R P Y V P P P K E S V P
gccaaagaggtaacaccagttcctgctgagcctgtcaagcaagaatcagttgcagccaaa 1080
A K E V T P V P A E P V K Q E S V A A K
gaggtaacaccagtccttactgagcctgtcactaaagaaccaacagctccaaggaggat 1140
E V T P V L T E P V T K E P T A P K E D
aaagcacctgcagaagtgaagatgttaagcctaggccgctgtctccttatgccgcctat 1200
K A P A E V K D V K P R P L S P Y A A Y
gaagacttgaaacctccaacatctcctattccggccacagcacttgggtgccaccaaagct 1260
E D L K P P T S P I P A T A L G A T K A
aaggagggtgatgcaactccggttccggagggtggaagaaactcaggctcctgttgaggct 1320
K E V D A T P V P E V E E T Q A P V E A
aatgcagttccaccaccagaaagtccctgttgagaccagtgctccagtagtagaagaagtg 1380
N A V P P P E S P V E T S V P V V E E V
aagcaagttgaggaaaagaaagagaggcctcttctccttatgctagctatgagaatcta 1440
K Q V E E K K E R P L S P Y A S Y E N L
aaaccaccttcatctcccactcctaaagcttctggtatccagaagagcgatacttggcg 1500
K P P S S P T P K A S G I Q K S D T L A
cctgttccaacagattctgacactgggtgaaagctcaacagttgcaacaactgtcactgag 1560
P V P T D S D T G E S S T V A T T V T E
gaggcagaagcacccccagccataccaaaaatgagaccttctccttatgcagcttac 1620
E A E A P P A I P K M R P L S P Y A A Y
gcagacctgaaaccaccaacctcaccactcctgcatcaaccgggtcccaagaaaacagca 1680
A D L K P P T S P T P A S T G P K K T A
cctgcagaagaaatctcagagttgcctggagggaatgatgtgctgcaaacgggtgatggt 1740
P A E E I S E L P G G N D V L Q T V D G

agtgtgatcagcactgaatctgcttctgtgccagagacagaaaactgttaacagtgtgaca 1800
S V I T T E S A S V P E T E T V N S V T
gacacttcccttacaccagaagaaagtgcagctgatcagccaaaaccaaggccattgtca 1860
D T S L T P E E S A A D Q P K P R P L S
ccttacacaatg 1872
P Y T M

>S-46(Stem) EU186369

GGCCAAATGGGCATCACGATTOGTAGCTCTTCTGTACTTTCAATOCCTTTAGAGTTTCTGAATCTGTCTOOCCATTCTTTOOCT
CTTCTACATTCAACCOCTGTGTGTGCTOCCAGATOCCTAGOOGITGCTTTCCCGCACITTTCAAAGCOCTCAAACCOCCATTACOC
ATCTOCAGATOOGITTTTCAATTTCAAAAAAGTTTAAACCTTTCTOGATGGCAGOGAOGAATTCAAOCTTGGAGAAGAAGGATGAG
AGCTOAGGAGAAAGGGGGGTGAGCTTTTGTCTGCGGGCCTACTTCCCTGGGACATOGTTGGAAGACGCAAAAGGTGTGGAAGGCA
ACTTGCTCTCTOCCACTOCTTAAAGGCOCTCTOCTOGGGGTCAACATTOGATTOGTGOCATCTGGTTGOGCTTOGTGTCTATTGTGT
GGOGTTGGATGTTGAAGGTGTTGCTACACCTGGGGACGCAATGAGAAAGGGCAGTTAGGTCATGGTGATATGATOCACOGTGAC
AGGCCAACGGTTGTGTCTGGACTCTOCAAAGTACAAGATTGTGAAGGCOGGAGCAGGGAGGAOCCATAOAGGTTGTTGTTAGOGATG
AAGGCAGGTCATTTGCTTTGGATGGAATAAGCATGGGCAGTTGGGTTTAGGCACOGGOGAAAAAOGGGTTGTGTCTGTAGAAGT
TGAATOGTOGOCTGTTCCATGTGTTGTCTCTGATGAGGTCAOGAGCATTGCTTGTGGGGCTGACTTCACTGTGTGGTTATCTTCT
ACTGAAGGAGCOCTCTATACTGACCOGCTGGACTCCCAATATGGTCAACTTGGTCATGGAACGATAACGAGTTCAATATGAAGG
ATGGCTCAGTTAACTCGOCTACGAAGCTCAGCOAGTCTAAAGOCATAGCOCTCTCTTGOCCGGGAAACGATTGTCAAAGTTGC
ATGTGGAGOGAATCATAACGTGCTGTGOGATAAGAATGGGTTTGTTTACACATGGGGCTTTGGTGGATATGGAAGGCTTGGACAT
AGGGAACAGAAAGATGAATGGTCTOCTOCCGATGATGTGTTTACAGAGGAATAATGTTTTGCOCTOCTAATGOCATTGTTTCAG
CTGGCTCTGCAAACCTCTGCTTGTACTGCGGGGGGAGGACAGTTATATATGTGGGGAAAGATCAAGAACAATGGTGATGATTGGAT
GTACCOCTAAOCTATGATGGATCTAAGTGGTTGGAACITGOGITGGATGGATTGAGGAAGCATGCATCATTGTTGGTGGOGAT
AGTTCITGCATAAGCTGGGGTCATGCTCAGTATGGTGAACITGGTTATGGTCCOCCOAGGTCAAAAATOCTCTGOGGGOGCOCTAAGA
AGGTGGATATACTOGAGGGAAATGCATGTAATGGGTGTGGCATGOGGGTTTGGCCATTCTATGGTCATAGTTGACAGAACAGAAGA
TATOGCTGATOGTCTTGAGCAGCTOGAGATATAOCAGCGGAAAGGATCATTAGAAGAGACTGTTGAACAACCCAAAGAAGAAACT
GTGGCAACTACAACAAGCAACAAGTACCTGCCAAAAGAGGTAGAAAGAGGAAAGCAGCAAAAGGCTTOGTCTGACTCTGAACAAG
ACAGTGGOGAAGAAAACAGCGACAAGGAGAAGGAAAGCTAAAGGCAGTGACAGTGACTATAGTGAAGATGGAGAAGAAGAAGOCOA
TGGCAAGAAACAGACCCTOCTGGCAGAGGACGTGGCOGTGGAGGACGTGGTGGGGGACCGCACCGGTAATGGAAGCTTTCG
COGGTGAAGACCGGTGGGGAAAGAGGAAGAACCGCAAGTTTTAGAAAACTTACTTTGACTCOGACTTCTCTOGATGTGGTTTA
ATTTCTTTTTAACAGTTTTTTTTTTGTTTCTTTTTAATACAATGAGAGGCTGAGAAACATTTTTATCAAACATTTGTTTAGGCT
GAGAACITTTGATCGGCTTTTGTATTTTGTATGTAACCACATCGAATGATTTATTTTTCTAAAAAAAAAAAAAAAAACTGAGGCCAT
AAGGGCC

atggcagcgacgaattcaaccttggagaagaaggatgagagctcggaggagaagggcggt 60
M A A T N S T L E K K D E S S E E K G G
gagcttttgttctgcgcgctacttccctgggacatcgttggaaagacgcaaaggtgtcgaa 120
E L L F C G A T S W D I V G R R K G V E
ggcaacttgctctctcccactcgcttaaggcctctcctcggcgtcaacattcgattcgctc 180
G N L L S P T R L R P L L G V N I R F V
gcatctggttgcgcttcgtgtcattgtgtggcgttggatggtgaaggtcgttgctacacc 240
A S G C A S C H C V A L D V E G R C Y T
tggggacgcaatgagaaagggcagttaggatcgttggatgatgatccaacgtgacaggcca 300
W G R N E K G Q L G H G D M I Q R D R P
acggttgtgtctggactctccaagtacaagattgtgaaggccggagcagggaggaacat 360
T V V S G L S K Y K I V K A G A G R N H
acggttgtttagcgatgaaggcaggtcatttgccttttggatggaataagcatgggcag 420

T V V V S D E G R S F A F G W N K H G Q
ttgggttaggcaccgcgaaaaacgggttgtgtctgtagaagttgaatcgctgcctggt 480
L G L G T A K N G F V S V E V E S S P V
ccatgtgtgtctctgatgaggtcacgagcattgcttgtggggctgacttcaactgtgtgg 540
P C V V S D E V T S I A C G A D F T V W
ttatcttctactgaaggagcctctatactgaccgctggactcccacaatatggtcaactt 600
L S S T E G A S I L T A G L P Q Y G Q L
ggcatggaactgataacgagttcaatatgaaggatggctcagttaaactcgctacgaa 660
G H G T D N E F N M K D G S V K L A Y E
gctcagccacgtcctaaagccatagcctctcttgcgggggaaacgattgtcaaagttgca 720
A Q P R P K A I A S L A G E T I V K V A
tgtggagcgaatcatacagtcgctgtcgataagaatgggtttgttacacatggggcttt 780
C G A N H T V A V D K N G F V Y T W G F
ggtggatggaaggcttggacatagggaaacagaaagatgaatggctcctcctcgccgcatt 840
G G Y G R L G H R E Q K D E W S P R R I
gatgtgtttcagaggaataatgtttgcctcctaatagccattgtttcagctggctctgca 900
D V F Q R N N V L P P N A I V S A G S A
aactctgcttgtactgcggggggaggacagttatataatgtggggaaagatcaagaacaat 960
N S A C T A G G G Q L Y M W G K I K N N
ggtgatgattggatgtaccctaaacctatgatggatctaagtgggttgaacttgcgttgg 1020
G D D W M Y P K P M M D L S G W N L R W
atggattcaggaagcatgcatcatttgttgggtgcggatagttcttgcataagctgggggt 1080
M D S G S M H H F V G A D S S C I S W G
catgctcagtatggtgaacttggttatgggtcccacgggtcaaaaatcctctgcccgcct 1140
H A Q Y G E L G Y G P H G Q K S S A A P
aagaagtgatatactcgaggggaatgcatgtaatgggtgtggcatgcgggttttccat 1200
K K V D I L E G M H V M G V A C G F C H
tctatggatagttgacagaacagaagatatcgctgatcgctttagcagctcgagata 1260
S M V I V D R T E D I A D R L E Q L E I
tacgacgggaaaggatcattagaagagactgttgaacaacccaaagaagaaactgtggca 1320
Y D G K G S L E E T V E Q P K E E T V A
actacaacaagcaacaagtacctgcaaaaagaggtagaagaggaaagcagcaaaggct 1380
T T T K Q Q V P A K R G R K R K A A K A
tcgtctgactctgaacaagacagtgggcgaagaaaacagcgacaaggagaaggaagctaaa 1440
S S D S E Q D S G E E N S D K E K E A K
ggcagtgacagtgactatagtgaaagatggagaagaagaagccaatggcaagaaacagacc 1500
G S D S D Y S E D G E E E A N G K K Q T
actcgtggcagaggacgtggccgtggaggacgtggtcgcgccggacgcaccggtaatgga 1560
T R G R G R G R G R G R G R G R G R T G N G
aaagcttcgccggtgaagaccgggtcggggaagaggaagaccacgcaagttt 1611
K A S P V K T G R G R G R P R K F

>S-47(Flower) EU186369

GGCCAAATGGGCCATCAACGATCAACGAAAAACAAAAAAGCAAGAATCAAAGTCAAGTCATCAAGAAAGCAAAACAACAAGTTTGA
ACAATGGAATTTGTAAGGTTTCCGATAGTCTCAATCCTCGAAGACATGCTAGAAAGTTCCCGAAGAGCACAACGAGAAGAGCCGCA
ACAATCCTTCAAGAGCTTACATGCGGGACGCAAAAGGCAATGGGGGCTACGCCAGCCGACGTCATCGAGCACGCGAAGCGGTACGT
TTTGGTGGTGGACATGCCTGGAATCAAAGGAGAGGAGATCAAGGTTCAAGTGGAGGACGAGAAGTGCCTTGTGGTGGAGTGGAGAG
AGGCAGAGAGAGAACAAGGAGAGCGAGGGTGTGAAGTATGTGAGGATGGAGAGGAGGATGGGAAGTTTATGAGGAAGTTTCAGT
TGCTGAGAAAGCTGATTTGGAGAAGATCTCTGCTGTTTGTAAAGATGGTGTGTTGAAGGTGACTGTTGAGAAGCTTCTCTCTC
TGAGCCTAAGAAACAAAGACTATCCAAGTCCAAGTTGCTTGTGAGTTTCTGGATTTTCTTCATGACATGTTGGTTTTGATTTCCG
TTTGAATGTACTTGAATGTGTGATGATGCGTGTTTAAAAAGTTGTTAAAAAGGTGAAATAAAAGATGTTCTCTGTTTAAAA
AAAAAAAAAAAAATACGGGCCATAAGGGCC

atggaatttgaaggtttccgatagtctcaatcctcgaagacatgctagaagttcccgaa 60
M E F V R F P I V S I L E D M L E V P E
gagcacaacgagaagagccgcaacaatcctcaagagcttacatgcgggacgcaaaggca 120
E H N E K S R N N P S R A Y M R D A K A
atggcggctacgccagccgacgtgatcgagcacgcgaacgcgtacgttttcgtgggtggac 180
M A A T P A D V I E H A N A Y V F V V D
atgcctggaatcaaaggagagagatcaaggttcaggtggaggacgagaacgtgcttgtg 240
M P G I K G E E I K V Q V E D E N V L V
gtgagtggagagagggcagagagagagaacaaggagagcgagggtgtaagtatgtgaggatg 300
V S G E R Q R E N K E S E G V K Y V R M
gagaggaggatggggaagtttatgaggaagtttcagttgcctgagaacgctgattggag 360
E R R M G K F M R K F Q L P E N A D L E
aagatctctgctgtttgtaacgatggtgtgtgaaggtgactgttcagaagcttctctct 420
K I S A V C N D G V L K V T V Q K L P P
cctgagcctaagaaaccaaagactatccaagtccaagttgct 462
P E P K K P K T I Q V Q V A

>S-48(flower) EU186352

GGCCAAATGGGCCATCAACGCAACTTTTCAATTTAGAGAGCTTTGCAAAACAGAACTTACAATCTTTTATTTCTCCTTCTAACTAAAATACATTTG
TCTGAAAAAOCATGATGAACACTAAGAAACTCATCAAGATGGCAAAGAAATGGCAACAAGAGCAGCTCTOCACAGGAGAAGAATCTCATTC
ACAGATCAAGTACTAGCGGCTCAAGGGCTGTAGAGAAGGGTGTGTTGGTGGTTTACACGGCAGATCAAAGOGITTTGCTTTTCCACTGAGGTA
CCTTAGCAACTCTGTTTTCCAGAGCTCTTGAAGATCTCTGAAGAAGAGTTTGGCCTCTCTGCTGGTGGACCAATCAAGITGOCATTGATTTCT
GTTTTGTTGGAGTATCTCATTAAAGTTGGTGGAGOGAAGAATGGATGGAGATACAGAAAAGCCTTTGTTAGTGTCAATATOCAGTGTAGATGCT
CTTCTTTACATTGTTCTTTAGAACTACAAGAACAACAATTGCTTGTATTTTGAAGTCTCTATGCATCTCAGAGTGTAAATGCATTTATAGITAG
ATTTTAAATCGAAAACAAAACAGAAATTTGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATACGGGCCATAAGGGCC

atgatgaactaagaaactcatcaagatggcaaaagaaatggcaacaaagagcagctctc 60
M M N T K K L I K M A K K W Q Q R A A L
cacaggagaagaatctcattccacagatcaagtactagcggctcaagggctgtagagaag 120
H R R R I S F H R S S T S G S R A V E K
ggttgtttcgtggtttacacggcagatcaaaagcgttttgcttttccactgaggtacctt 180
G C F V V Y T A D Q K R F A F P L R Y L
agcaactctgtttccaagagctcttgaagatctctgaagaagagtttggcctctctgct 240
S N S V F Q E L L K I S E E E F G L S A
ggtggaccaatcacgttgccattcgattctgtttcgtggagtatctcattaagttgggtg 300

G G P I T L P F D S V F V E Y L I K L V
gagcgaagaatggatggagatacagaaaaggctttgtagtgtcaatatccagtgctaga 360
E R R M D G D T E K A L L V S I S S A R
tgctctctttacattgcttcttagaactacaagaacaacaattgcttgattt 414
C S S L H C S L E L Q E Q Q L L V F

>S-50(Flower) EU186334

GGCCAAATGGCCATCACCGGAATTACACATTTGAGGAGCAAACAGAAAGCTAAGTATGGAGAGATCOGTTTCTTOGATCTTOGC
GGCGATAACGAACCTCCCGAATGATCGGAGCAGCGAGCTGGATAACCGCGCAATGATCGGAGGCTCGCTTACTCCCGCTCCTTTCC
ACCACCTCCCAACGGCCCGGAACGCGCCGGCTAAGCCTTTCTCGATAGGACGGTCTCCACCATCGATATGCGCGCGGAGATATA
CTCTGTGACGGGATGATGTGCTTTTGGGGAAGGAAAGCGCGCGCGGATTTGGAAAGCTTCGGCTTTGCGTATGGTTTTG
GTGGTTTTTGGTGTGCTGAGAAATGGAATCGGCAGATGAAGAGATTGTTTATGTTGATTTOGCTTAAOCTGGCGTACTCTAACA
CAGAGCTGTTGATTGGGCTATTGACTGGGGGTGTAGGTTTGGTTTTCTGATGCATTCCATTGACATTTGGATGTGGTCTCCTGAC
GTTTTCTTTATTGCAATGGCGACTTCAAGGAAGGAGCCTGATCATGCTTACTCATAAGGGTACAAAAGACTTGAAGTTCTTTCTG
CTTCTACTAATGCTACAGCTGTTTCTTATGTTTCATGTGCTTCTCCTTAGCTGTGGAAGCTCTTCATGCATTTGTTCAAGATGAAT
CAGAGCACAAAGCATTATCTTATGATATCAGCGGTAACAATCTGCTGGTGAACCTACTTGGTGTGTTGGTTCCTCCGGAATTATGC
TOGTATGAATATTGTGTACAGAAAAGCAGAAGATATGAACTACCACTCCGTTTGCCTTGCATGTCATATCAGATTCATCCCGCAGG
TCTGATACTGGCATCCTGCTCCTCTCTCGGGGTGAAAATGCAGAGGCTCTATGTTGGGATTGGTATCAGTTACAGTGTCT
ATGCTTGTATGOCACCTTTCAAAGOCACCTGGTGGTGTCTTCTTCTCAGATGGCACTCCAAACATTCCTTCTTOGCATTAAGCA
AATGCTTGOCTCAGATTACTTCTCGAGAGGAGTATAGAGTTTTACAGGCACTTTCTGGGAGGTTGTGCGCGGOCACACTGT
TGGCTCACTCAGAAATOCAGGTGAAGAGCGGATAGATGAAAGGCCCTTACTGCAATATGTGTATGATGATAACATGATTGGGT
GTACAAGACTTGACGCTGCAAACAGATTACAGCTGAGCTGCATCTACTTCTATGTTTTCAAATACTGAGGACTTTGGATGTATAC
TAGTAGAGATTATGGTCTATAAGAAGATTAACACTTGGTTTTCAAGCTTGGAGTTTCTTGTACACTTGTGTTAGTTTTTCTTT
TCTCTTTAATTCCTTTTCCATTTGCTTTTTGAOCCACACACACAAGGACCACAATCTTTGTAACCTCTTTTAGCATTCAAGT
TTGTGCGTCTTTTTGGCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAATACGGGCCATAAAGGGCC

atggagagatccgtttccttcgatcttcgcgccgataacgaactcccgaatgatcggagc 60
M E R S V S F D L R G D N E L P N D R S
agcgacgtcggatacgcgccaatgatcggaggctcgccttactcccgcctttcaccac 120
S D V G Y A A N D R R L A Y S R S F H H
tcccacggccccggaacgccccgcggttaagcctttctcgataggacgggtctccaccatc 180
S H G P R T P A A K P F L D R T V S T I
gatatgccgcccggagatatactctgtcgacggggatgatgtgcttttcgggggaagggaaa 240
D M P P E I Y S V D G D D V L F G E G K
gccccggcgccgattgggaaagcttcggctttgcgatggttttggtggttttggtgtg 300
A A A A I G K A S A L R M V L V V F G V
ctgagaaatggaaatcggcagatgaagagattgttatggtgatttcgcttaacgtggcg 360
L R N G N R Q M K R L F M L I S L N V A
tactctaccacagagctggtgattgggctattgactggcggttaggtttggtttctgat 420
Y S T T E L L I G L L T G R V G L V S D
gcattccattgacattggatgtgggtctcctgacgttttcttattgcaatggcgactt 480
A F H L T F G C G L L T F S L L Q W R L
caaggaaggagcctgatcatgcttactcatacgggtacaaaagacttgaagttctttctg 540
Q G R S L I M L T H T G T K D L K F F L
ctttcactaatgctacagctgtttctatggtcatgtcgttctccttagctgtggaagct 600
L S L M L Q L F L M F M S F S L A V E A

cttcatgcatttgttcaagatgaatcagagcacaagcattatcttatcgtatcagcggta 660
 L H A F V Q D E S E H K H Y L I V S A V
 acaaactctgctggtgaacctacttgggtgttgggttctccggaattatgctcgtatgaat 720
 T N L L V N L L G V W F F R N Y A R M N
 attgtgtacagaaaagcagaagatatgaactaccactccgtttgcttgcattatca 780
 I V Y R K A E D M N Y H S V C L H V I S
 gattccatccgcaggtctgatactggcatcctggctcctctctcgggggt 831
 D S I R R S D T G I L A P L S R G

>S-51(Flower) EU153262

GGCCAAATCGGCCATCACGCTTGAACAACAACTCTCTOGTCACACATTOGTTTGGACTCTCTTOGTTGTGTTGTGATTTATAT
 ACACACACAACAOCGACTTCTATTTATAAATATTTTCTAAAACTTCAGOGATGAATTTATCTACGAGAATATCATOGAGGGAT
 AAGAAGTCCAATCTTTATTACATAAOCCTAGTGGGGTCTCTGCATCGGAAGCTAOCCTOCTCGGCTCTGGCAAAACACCACGG
 TGAATCCACGGCGCCCTTTGACACATCAACCGATGCAACACCGTGGGAGAAATTCOAAAACAACCTTCCAGACGGATCTCGA
 CTTCAAGCGCACCAACOCCTACGATCAOCCTOOGTGGGGTAAOCGCGTGAGITTCOOGTGTGOGACGCGCGCTGAGC
 GAGCACACGCGGTGGAGGACGGAAGOGATOGCTGAAGITCTCTCGGAGAGGCTGGAGTACAGGCAGAGGCACTGTCCGACA
 GAGAGGAAGCGCTGAAGTGTGTATTCCGGCGCGTAOCGTTACAAGACGCGITTCGGTGGCGGAGAGCGCGACGTCGGGTG
 GTTTGCTAATGTGCTCACACGGAGCTTACGGTTGAGAAGAAGATCAGAACTGGGTCCGGTACGAGAATGATCGGTTTTGGTTT
 OCTGGTGGCGGTACGATGTTTCCAGTGGGGCTGATGCGTATATTGATGATATCGGAOAGTTGATTGATCTCAGOGACGGTTCGA
 TACGTACCGCTATCGATAACGATTGTGGGGTGGCTAGCTTTGGTGCATATCTTTATCAAGAAACATCACAACCATGTGTTTGC
 TCCAAGGATACACATGAAGCTCAGGTTTCAAGTTTGCACCTGAGOGTGGOGTGOOGCAATGATCGGAATCATGGCCACAATCCGC
 TTAOCGTAOOCCTCTAGAGOCCTTTGACTTAGCACATTGCTCTOGTTGCTTATOCCTGGGGGAAAAAGATGGGGTTTACTTGA
 TGGAGGTGGACAGGGTTTTAAGAACAGGAGGGTACTGGATACTGTCTGGACCAOOGATTAATTGGCAGAAAAGATGGAAAGGATG
 GGAAAGGACGATGGATGATTTAAATGAAGAGCAGACACAGATCGAGCAAGTCCGAGAAAGCTTGTGTTGGAAGAAAGTTGTTCCAG
 AGAGATGATCTAGCTATCTGGCAAAAGOCCTTTTAAOCACATTCACTGTAAAAAATGAGACAAGTTTTGAAGAATCCGGAGTTTT
 GTOGCTATGATCAAGATCCCGACATGGCTTGGTATAOCAGAGATGGATTCTTGTGTTGACGOCATTACCTGAAGITGATGAGTGGGA
 GGATCTAAAGACGGTGGCTGGAGGGGAAGGTGGAGAAGTGGCGGCTAGGTTAAACGCGGTTCTCTAGGGTAAACAACGGTGTAT
 CTCAGGAAATAAAGCCAGAAGCTTTCTTGGAGGACAOCGAACTGTGGAAGCAGAGAGITTTCTTATTACAAGAAATTAGATTATC
 AGTTAGGTGAACTGGGAGATACAGAAATTTACTOGACATGAACGCTTACCTGGTGGATTGOGGGCGGCTCTAGCTGATGAGOC
 GGTTTTGGTTCATGAACGTTGTCCCGTGGAGGOGAAGCAATACTCTAGGTGTCATTTACGAGCGTGGTCTAATAGGAACGAT
 CAAAACCTGGTGTGAAGOGATGTGACGATTOCAAGGACGATGATTTTATCCATGCTGACTCGGTTTTCAOGTTGTAOCCAGATA
 AGTGTGAACCGGAGGATATATTGTTGGAGATGGACCGGTTCTTAGACCGGGTGGTGGTGTGATTATAAGAGACGACGTCGACGT
 TTTGATTAAGGTTAAGGAATTAAGCAAAGGGTTCAATGGCAAGGTAGAATTGCTGACCAOGAGAAGGGTCTCATGAGAGAGTG
 AAGATTTACTATGCGGTGAAACAGTATTGGACTGTCCAGCAOCTGAGGAAGATAAAAAACAATACTAAAGCACTCTCATGATTTG
 AGTTTTCTCTCTCTTTTCAAGTTTCTTATAATGTTATCTTTGTTTTGATTTTTTTTCAAAAAAACAATAAATTCGCAATG
 ATTGTTTTACATTTTAAACAATGAAATAAACAAGAAAAAAGTTGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAATCGGGOCATAAGGGOC
 atgaatttatctacgagaatatcatcgagggataagaagtccaatctttattacataacc 60
 M N L S T R I S S R D K K S N L Y Y I T
 ctagtggcggctcctctgcatcggaagctacctcctcggcgtctggcaaacaccacgggtg 120
 L V A V L C I G S Y L L G V W Q N T T V
 aatccacgcgcccctttgacacatcaaccgatgcaccaccgtgagagaaattctccaaa 180
 N P R A A F D T S T D A P P C E K F S K
 acaactccacgacggatctcgacttcaacgcgcaccacaaccctcacgatccacctccg 240
 T T S T T D L D F N A H H N P H D P P P
 tcggcggtaaccgcccgtgagttcccgctgctgacgcccgcgctgagcagacacgcgg 300
 S A V T A V S F P S C D A A L S E H T P

tcgcaggacgcaagcgatcgctgaagttctctcgggagaggctggagtacaggcagagg 360
C E D A K R S L K F S R E R L E Y R Q R
cactgtcccgcacagagaggaagcgctgaagtgctgattccggcgccgtacggttacaag 420
H C P D R E E A L K C R I P A P Y G Y K
acgccgttccggtggccggagagccgcgacgtcgcgtggtttgtaatgtgcctcacacg 480
T P F R W P E S R D V A W F A N V P H T
gagcttacgggtgagaagaagaatcagaactgggtccggtagcagaatgatcggttttgg 540
E L T V E K K N Q N W V R Y E N D R F W
tttctgggtggcggtagcgtggttccacgtggcgctgatgcgtatattgatgatatcgga 600
F P G G G T M F P R G A D A Y I D D I G
cggttgattgatctcagcgcggttcgatacgtaccgctatcgataaccagttgtgggggtg 660
R L I D L S D G S I R T A I D T S C G V
gctagctttgggtgcatacttttatcaagaaacatcacaaccatgctggttgcctcaagg 720
A S F G A Y L L S R N I T T M S F A P R
gatacacatgaagctcaggttcagttgcacttgagcgtggcgtgccggcaatgatcgga 780
D T H E A Q V Q F A L E R G V P A M I G
atcatggccacaatccgcttaccgtacccttctagagcctttgacttagcacattgctct 840
I M A T I R L P Y P S R A F D L A H C S
cgttgccttatcccttgggggaaaaacgatgggggttacttgatggaggtggacaggggt 900
R C L I P W G K N D G V Y L M E V D R V
ttaagaccaggagggtactggatactgtctggaccaccgattaattggcagaaaagatgg 960
L R P G G Y W I L S G P P I N W Q K R W
aaaggatgggaaaggacgatggatgatttaaatgaagagcagacacagatcgagcaagtc 1020
K G W E R T M D D L N E E Q T Q I E Q V
gcgagaagcttggttgaagaaagttgttcagagagatgatctagctatctggcaaaaag 1080
A R S L C W K K V V Q R D D L A I W Q K
cctttaaccacattcactgtaaaaaatgagacaagtttgaagaatccggagttttgt 1140
P F N H I H C K K M R Q V L K N P E F C
cgctatgatcaagatcccgcacatggcttggatatacgaagatggattcttgtttgacgcca 1200
R Y D Q D P D M A W Y T K M D S C L T P
ttacctgaagttgatgagtcggaggatctaaagacggtggctggaggggaaggtggagaag 1260
L P E V D E S E D L K T V A G G K V E K
tggccggctaggttaaacgcggttccctcctagggtaaacaacggtgatctcaaggaaata 1320
W P A R L N A V P P R V N N G D L K E I
acgccagaagcttcttggaggacacggaactgtggaagcagagagtttctattacaag 1380
T P E A F L E D T E L W K Q R V S Y Y K
aaattagattatcagttaggtgaaactgggagatacagaaatttactcgacatgaacgct 1440
K L D Y Q L G E T G R Y R N L L D M N A
tacctcgggtgattcgcggcggtctagctgatgagccggttgggtcatgaacgttgtc 1500
Y L G G F A A A L A D E P V W V M N V V
ccggtcgaggcgaagcacaatactctaggtgtcatttaccgagcgtgggtctaataggaacg 1560
P V E A K H N T L G V I Y E R G L I G T

tatcaaaactggtgtgaagc gatgtcgacgtatccaaggacgtatgattttatccatgct 1620
 Y Q N W C E A M S T Y P R T Y D F I H A
 gactcgggttttcacgtgtaccaagataagtggaaccggaggatatattgttgagatg 1680
 D S V F T L Y Q D K C E P E D I L L E M
 gaccgggttcttagaccgggtggtggtgtgattataagagacgacgtcgacgttttgatt 1740
 D R V L R P G G G V I I R D D V D V L I
 aaggttaaggaattaagcaaaggggttcaatggcaaggtagaattgctgaccacgagaag 1800
 K V K E L S K G F Q W Q G R I A D H E K
 ggtcctcatgagagagtgaaagattactatgcggtgaaacagtattggactgtcccagca 1860
 G P H E R V K I Y Y A V K Q Y W T V P A
 cctgaggaagataaaaacaataactaaagcactctca 1896
 P E E D K N N T K A L S

>S-52(Stem) EU186370

GGCCAAATCGGCCATCACGAAGCCAAOCCGAAGTATTTCTTTATTAATCAGTCTCTCTCACGGGGTGGCTCTGTGAGATTGGAT
 CCATACACGACCCCCCTTCTGCTTCACTCTCTCTTACACACTGTCCAGTTTCAACTCGTACATATATATACTCATAGAGAGAG
 AGAGAGAGAGAGCTCTCAAAGAAGAAGAAGAAATCTGATATCATOGITTTTTGTAATAACAGAGOGTATCTTTTGCTCCAAGGAGA
 AGGAGAAAACACCAAGACAACAAGGGAGCTTAAAAATGTCAATGOCCTGCAACGTGGCGTCTCAGGAGGAGTACGAGITTOCG
 ACAGCAGTGATGATCTCAGAGACTCTCAAATGAAGGACAAGTCAGAAAAGGAAGGOCCTTAAOCTTGAGGTTTCTTTTGCITTT
 CCTCTTTAOCAGCAACAGCAATACTCAATCTACTGATCCTTACAACGCAAGGAOCCAGACACAGGTTGATGCTTCTCTTTCTCAAG
 ATCAGTTTGGTCTAATCGTGGTTCCTGCTCTTTGCTGGTTCCTTCTGGTGGACGATCTCCATCTCCACCCTTCCAGAGGTCACG
 TGTATCATAACTACAGGAGATTACAGGAGCAGCTTGTGTGACACTTGTGGATATTGGTGAGATCTCTGCTGGTCCACTAGGTTG
 GAAAGAAATAGAGTATTGTAGTGTAGAATCCGAGAATGTTCTCTTTAAOCTTTCCGAGAGTCTTGTATGGTTCCTGGGG
 CCTGGTGGGTGAGACAGGAGTGTGGTTTAAOCCOCTGGATTATAAGGTTCTCTTAGGTGGCTACTGGTAAAGATGTGA
 TATGGTATCATAOCTTAAAGATCACTGCTGATGAAGTGTGACTTCTGGTAGTATCAACAAGAGGATGATGATGATGGATGATGA
 TCAGATCTCTTTOOCTCCOCTCTCTATGTTTGTAGGTTGAAGACTATTCTCATCAGATTGCTCAGATGATTGGGATTAAG
 AATGATAACTTCATTGAAGCTGGTGTGAGGACTATATTGGATATTGGATGTGGTTATGGTAGCTTTGGAGCACATCTACTCTCAA
 AACAGCTTTTGACAATGTGCATAGCAAATCTGAAGCCTCTGGTAGOCCAGTTTCACTTACACTTGGAGGGGTCTAOCCTGCTAT
 GATTGCTTCTTTTCAOCCAGTTGCOGTATCCTCTCTTCTCTTTGATATGTTGCATTGCTCAACATGTGGTATTGATTGG
 GACCAGAAAAGAGGGCTTCTCTTGTGAAGTTGACAGGGTCTGAAGCCTGGAGGTTACTTTGTTTGAAGTCTOCCCTTAAO
 GTGCTCTGTAACAAAGAGGATATAAGAGATGGAACCTTTGTTTATGATTTTGTGAAAGCATCTGTTGGACTCTTTTATCTCAGCA
 AGACAAGACAGTTGTTTGGAAAAAGACAATCAAAAACCAATGTTACAGTTCCOCCGAAAGCCGGGGTGGGACCTTCTGTGTGAGC
 AAAGGGCATGAGGTGGAGTCTCCTTATTACAGACCCCTTCCAGATGTGCTTGGTGGGACACGAGTAGGAGGTGGATTOCCATTG
 AAGGCAGGACAAGATGGOCTAGCCGGTCTAACATGAACAAGACTGAACCTTCACTCTACGGTCTTCAOCCGGAGGAGGTTGGAGA
 AGATGCAGCCAACTGGAAAGCAAAGTAAAGAGACTACTGGTCTCTCTTGTCTOCTCTGATATTCTCTGAOCCACCCCAAGAGAOCT
 GCGATGAAGATCCCTCTCTCTTATAACATGCTCAGAAAAGTTTTGGACATGAATGCTCAATAOCCGGTGGGCTCAATGCOGCT
 TGTTGGAAGCTAAAAATOGGTATGGGTCATGAATGTTGTCCTACAGCTGGACCAAAOCCOCCOCCATGATCCTTGAOCCGAGG
 CTTTGTGGGTCTTACAGACTGGTGTGAAGGTTTCTACTTATOCAAGAACATATGATCTGGTTCATGCAGACAGTCTTTTA
 TOOCTTACAGAGTACAGCCAGAGCTCATGCTCGCTTCTGCAAAATATTGACAGAGGTTGATAGATTACTTCTGTCAGAGGGAT
 GGGTGATAATCCGTGACACAGTGCAGCTGGTGAAGGGCAAGAGCTTTGACAACGCAGTTGAAGTGGGAGGCTAGAGTTATAGA
 GGTTGAAAGCAGTAGTGATCAGAGACTTCTCATCTGCAAAAACCATTTAACAAGAGACAATCAATTTGAAACAAGAGGAAGTAA
 AGGAGAAGAGTTGTTTTATTTTTGTAACAAGTCTCACAGTCAAGAACTGTGGTGGGATACAGGGGAAGAAGAAGATGATGA
 AAAGAGAAGGGAGATGAAATATATGCTGCOGGGGGAGTAAAGACCGCCGGTGAAGITTTCTTTCATGAGITTOCCATTTTACAGAA
 TGTTACATTTATATTACTTTGGGTTACTATTTTTATTATATACAGTGA AAAAAGAAATAATOCATATTGTGAAGATGATGTT
 TTATGAAATATAAGTTGACAAACTCTATTCAGTAGAATAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGAGGGCCATAAGGGCC
atgtcaatgccactgcaacgtggcgtctcaggaggagtacgagttccgacagcagtgat 60
 M S M P L Q R G V S G G V R V S D S S D

gatctcagagactctcaaatgaaggacaagtcagaaaaggaaggccacttaaccttgagg 120
D L R D S Q M K D K S E K E G H L T L R
tttccttttgctttcctctttaccagcaacagcaataactcaatctactgaccttacaac 180
F P F A F L F T S N S N T Q S T D P Y N
gcaaggaccagacacaggttgatgcttctctttctcaagatcagtttggcctaatacgtg 240
A R T R H R L M L L F L K I S L V L I V
gttctcgctcttgctgggtccttctgggtggacgatctccatctccaccacttcgagaggt 300
V L A L A G S F W W T I S I S T T S R G
cacgtgtatcataactacaggagattacaggagcagcttgtgtcagacttgttgatatt 360
H V Y H N Y R R L Q E Q L V S D L L D I
ggtgagatctctgctgggtcccactaggtggaaagaaatagagtattgtagttagaatcc 420
G E I S A G P T R W K E I E Y C S V E S
gagaactatgttcccttgctttaacgtttccgagagcttggatcggttctgctgggcctggt 480
E N Y V P C F N V S E S L D R F C G P G
gggtcgagacaggagtggttgggtttaccaccgggtggattataaggttcctcttaggtgg 540
G S R Q E C L V L P P V D Y K V P L R W
cctactggtaaagatgtgatatggatcataacgttaagatcactgctgatgaagtgttg 600
P T G K D V I W Y H N V K I T A D E V L
acttctggtagtatcaacaagaggatgatgatgatggatgatgatcagatctctttccgc 660
T S G S I N K R M M M M D D D Q I S F R
tccgcgtctcctatggttgatgaggtgaagactattctcatcagattgctcagatgatt 720
S A S P M F D E V E D Y S H Q I A Q M I
gggattaagaatgataaacttcattgaagctgggtgtgaggactatattggatattggatgt 780
G I K N D N F I E A G V R T I L D I G C
ggttatggtagctttggagcacatctactctcaaaacagcttttgacaatgtgcatagca 840
G Y G S F G A H L L S K Q L L T M C I A
aactatgaagcctctggtagccaagttcagctaacacttgagaggggtctacctgctatg 900
N Y E A S G S Q V Q L T L E R G L P A M
attgcttcgittgttcaacgcagttgccgtatccttctctttcctttgatattgttgcatt 960
I A S F V S T Q L P Y P S L S F D M L H
tgctcaacatgtggattgattggggaccagaaagacgggcttctccttggtggaagttgac 1020
C S T C G I D W D Q K D G L L L V E V D
agggttctgaagcctggaggttactttgtttggacgtctccgcttacgagtgctcgtaac 1080
R V L K P G G Y F V W T S P L T S A R N
aaagaggatataaagagatggaactttgttcatgattttgctgaaagcatctgttggact 1140
K E D I K R W N F V H D F A E S I C W T
ctttatctcagcaagacaagacagttgtttggaaaaagacaatcaaaaccaaattgttac 1200
L L S Q Q D K T V V W K K T I K T K C Y
agttcccgggaagccgggggtgggaccttctgtgtgtagcaaagggcatgaggtggagtct 1260
S S R K P G V G P S V C S K G H E V E S
ccttattacagaccgcttcagatgtgtcttgggtgggacacgcagtaggaggtggattccc 1320
P Y Y R P L Q M C L G G T R S R R W I P

attgaaggcaggacaagatggcctagccggtctaacaatgaacaagactgaactttcactc 1380
 I E G R T R W P S R S N M N K T E L S L
 tacggctttcaccgaggagggttgagaagatgcagcgaactggaaagcaaacgtaaga 1440
 Y G L H P E E V G E D A A N W K A N V R
 gactactggctctctgtctcctctgatattctctgaccacccaagagacctggcgat 1500
 D Y W S L L S P L I F S D H P K R P G D
 gaagatccgctctcctcttataacatgctcagaaacgtttggacatgaatgctcaatac 1560
 E D P S P P Y N M L R N V L D M N A Q Y
 ggtgggctcaatgccgccttggtggaagctaaaaaatcgggatgggtcatgaatggtgtc 1620
 G G L N A A L L E A K K S V W V M N V V
 cctacagctggaccaaacctccaatgatccttgaccgaggccttggcgtctta 1680
 P T A G P N H L P M I L D R G F V G V L
 cagcactgggtggaagcgtccctacttatccaagaacatgatctggtcatgcagac 1740
 H D W C E A F P T Y P R T Y D L V H A D
 agtctttatcccttcagacgagtcagcgaagagctcatgctcgcttctgcaaatattg 1800
 S L L S L Q T S Q R K S S C S L L Q I L
 acagaggttgatagattactctgcccagagggatgggtgataatccgtgacacagtgcag 1860
 T E V D R L L R P E G W V I I R D T V Q
 ctgggtggaagcggcaagagccttgacaacgcagttgaagtgggaggctagagttatagag 1920
 L V E A A R A L T T Q L K W E A R V I E
 gttgaaagcagtagtgatcagagacttctcatctgccaaaaaccatttaccagagacaa 1980
 V E S S S D Q R L L I C Q K P F T K R Q
 tcaatt 1986
 S I

>S-53(leaf) EU186349

GGCCAAATGGCCATCACGATACAAGCAAAAAAGTTAAAAACAAGAAGTGAGGAAAAATGAGTAGGTCCGATGCTCAGCTTCAAG
 ATGTCCTCGTCTATGGTAGCTTTCAGGAGCCTGATATOGTCAACATAATGCTTGAAOGTACTOOGGAAATCATCTCTGTAAACT
 COCTGGCTTTAAGAGGTTTAGGCTCAAAGGAOGITTTGTATCCATGTATTGTGCOGTCTGAGGCAGGAGAAGTCCATGGAAAGGTG
 CTAATGGGATTGAOOGATAAAGAATCATCAATTTAGATGCTGTTGAGGGCAATGAATAOGAAGAGTACAGITGAAGTTGTAA
 GGAAGGAAAAATTCTGOGAAGATGATAGTGAACATATATATGGATTAACAAAAATGATCCTGATATGTATGGAGAATGGGACTT
 CGAGGAGTGGAAACAGCTACACATGCOGAAATTCATGGAGACTATCAAAGAAATCATTGAAATAAATAAGAATCATCAAGGAAAG
 GGAGTAGAAGATTACACCCAAATTCACAAAAAOCITGGGGATGCTCOGTTGTCTTGAATGGATTTTATGTTGGCTATGTTCT
 ACATAATTTATAAATTTCCAAATAAATAAAGCCTAGAGATTAATGGGTACTGTGGAGATCATGTCTTCTTGAAGATTTGTGTTA
 TGTGGTTTGTATTGTATAATGGGTACTGTGGAGAATTATGTTATAAAAAAAAAAAAAAAAAACATGGGCCATAAGGGGCC
atgagtaggtccgatgctcagcctcagcatgtcttcgtctatggtagctttcaggagcct 60
 M S R S D A Q L H D V F V Y G S F Q E P
 gatcctgcaacataatgcttgaacgtactccggaaatcatctctgtaacactccctggc 120
 D I V N I M L E R T P E I I S V T L P G
 ttaagaggtttaggctcaaaggacgtttgatccatgtattgtgccgtctgaggcagga 180
 F K R F R L K G R L Y P C I V P S E A G
 gaagtccatggaaaggtgctaattgggattgacggataaagaactatcaaatttagatgct 240
 E V H G K V L M G L T D K E L S N L D A

gttgagggcaatgaatacgcgagaaagtgcagttgaagttgtaaggaaggaaaattctgcg 300
 V E G N E Y E K V T V E V V R K E N S A
 aagatgatagtgaacatataatggattaacaaaaatgatcctgatatgtatggagaa 360
 K M I V K T Y I W I N K N D P D M Y G E
 tgggacttcgaggagtggaaacagctacacatgccgaaattcatggagactatcaaagaa 420
 W D F E E W K Q L H M P K F M E T I K E
 atcattgaaataaataagaatcatcaaggaaaggagtagaagattacacccaaattctt 480
 I I E I N K N H Q G K G V E D Y T Q I L
 cacaaaaaccttgggggatgctccggtgtct 510
 H K N L G D A P L S

>S-54(Stem) EU186373

GGCCAAATGGGOCATCACGGGGGAATCTACTGTCACTCACACTATCCTTCTCTOGAOCOCGAGCTGATTTCCGGGTCAGATC
 TAGATCCGGATCCGGACTCGCGCTGAGTTATGAAGCCCTCCAGGAGGAGGAGTCCGCGGACTCCTCCGAAGCTCTTCCACTA
 CGTCCCTGGTCCATCGCTCTTCTCGGATTGACTTGCCTCTACTATGGCTCTTCCCTCGCTCCCGGATCTAGAAAGTOOGAC
 GAGTTGAGCGGATCTAGCCCCGCTCGCGCCGGATTCCGAGCAATCGAGATGGAGAGAGCCCGGTGGAAGTTCTAGAAGCATTCC
 CGATATGTGATTOGAAACTCTGGATCTTATAOOGTGTGGATAGAGATCTTATCAOCAGCTGAAACTGAGACTCAACTTAAC
 GTTAATGGAGCACTATGAGCATCACTGCOOCTCCACOGGAACGCGTTTCAATTGCOCTTGTCTCCTCCAGCTGGTTATATGATA
 CCTATAAAGTGGCTGTAGTAGAGAOGAGGTGTGGAAAGGOGAACATTOCGCATAACAOCCTTGGCAAGAGAAATCTGATCAGA
 ATTGGATGGTTGTTAATGGTGATAAGATCAATTTTCCCGGGGAGGAACACATTTCCACTACGGAGCTGACAAGTACATAGTTTC
 CCTTGCCTCAGATGCTGAAATTOCCTGGTGACAAACTCAACAATGGAGGAAGCATTGAAATGTTCTTGATGTTGGCTGCGGGGTA
 GCTAGCTTCGGAGCTTATCTTCTCTCACAGCATCATAGOCATGTCTCTTCTGCTCCTAATGATGTCCACCAGAACAGATCCAGT
 TTGCTCTAGAAGGAGGGATCCCATCAACACTTGGTGTCTTGGGACTAAGCGCTTCCATAOCCAGCAGATGTTTGAACCTTGC
 TCACTGCTCTAGATGTGGATAGATTGGCTTCAAAGAGATGGGATCTTGTGCTGGAACCTTGATAGGCTGCTCAGAOCTGGGGT
 TACTTTGTATACTGTCCCTGAAGCTTAOCGACAOCAGAAAACAGAAAGATTGGGACTGGATGCATGATCTCTCCAGGA
 GAATGTGTTGGAGGGTGTGGCCAAOCGAGAOCAATCTGTTATATGGGGAAAAOCCGATATCCAACAGCTGTTACTTGAAGAGGGG
 TOCAGGTGTCCAACTCCGCTTTGTCTTCTGGAGATGACOCAGATGCAACTTGGAACTTCCATGAAAGCTTGCATAAACOCG
 TACTCAGTGAGGATGCATAAAGAAAGATGGAGTGGGCTTGTCCCTGGCCACGGAGACTGACAGCTCCTCCACCAGCTCTTGAAG
 AATCGGTGTCACTCCCGAGCAATTOGTGAAGATAOCGAAACATGGCGGCATAGAGTGATGGAATACTGGAAGCTGCTTAAACC
 AATGGTGCAAAAGAAGCTCTATTAGAAAAGTATGGACATGAGCTCAAACCTCCGGGGTTCGAGCTGCTTAAAGATAAAGAT
 GTATGGTAATGAAOCTCATAOCCGTACAATOCACOCGAGAATGAAGATCATTTAOCAGCTGGOCCTTATCGGAGOCACATG
 ATTGGTGTGAAGCCCTTGGACACATAOCCAGAACATTTGACCTTATOCAGCGTGGAAACACATTCACAGAAAACCAAGCAOCTGG
 ATGCAGCATOGAAGATTTTTTATCGAGATGGACCGGATACTACGOCAGAGGGTTTGTGATAATTCGTGACACATCAGAGAAT
 ATTAGCTACATCAAGAAGTATTTGACATTGTTGAAATGGGACAAATGGATGACAGAGACTACTCCAATGGTACTCTCTGTCCG
 CGGCCAAAGACGAGAGAGTTTTGATAGCCAGAAAGAACTTTGGAGCGTGGCGGCCATTTCCAGAGTTGTGAAAAGGTTTACTTTT
 ATTGCAAGCCATCTATTTACTTGTATGAGGAAGTGAATTTGCACAAGATTCATAOCTAGTTATGATTTTGTATTTGTTGTAGG
 AAAAAAATGOCATCGTGTGTTTGTAGTCCAAATTTAAATTTAAATTTGTTTTCTCGAAAAAATTTTAACTGAG
 GCCATAAGGGCC

atgaagccctccaggagcgcgagcgcgactcctccgaagctcttcacctacgct 60
 M K P S R S E R V R A T P P K L F T Y V
 ctgctcggcttcacgctcttctcggattgacttgccctctactatggctcttctcctcgt 120
 L V G F I A L L G L T C L Y Y G S S F A
 cccgatctagaaagtccgacgagttcgacggatctagccccgctcgcgcccggattcgcg 180
 P G S R K S D E F D G S S P A R A G F A
 agcaatcgagatggagagagccgcgctcgaagttcctagaagcattccgatatgtgattcg 240
 S N R D G E S R V E V P R S I P I C D S

aaacactcggatcttataaccgtgtttggatagagatctttatcaccagctgaaactgaga 300
K H S D L I P C L D R D L Y H Q L K L R
ctcaacttaacgtaatggagcactatgagcatcactgccctccaccggaacgccgttc 360
L N L T L M E H Y E H H C P P P E R R F
aattgccttgttccctccagctggttatatgatacctataaagtggcctgttagtaga 420
N C L V P P P A G Y M I P I K W P V S R
gacgaggtgtggaaggcgaacattccgcatacacaccttgcgcaagagaaatctgatcag 480
D E V W K A N I P H T H L A Q E K S D Q
aattggatgggtgtaatggtgataagatcaatctccgggggaggaacacattccac 540
N W M V V N G D K I N F P G G G T H F H
tacggagctgacaagtacatagttcccttgctcagatgctgaaattccctggtgacaaa 600
Y G A D K Y I V S L A Q M L K F P G D K
ctcaacaatggaggaagcattcgaaatgttcttgatggtggctgcgggtagctagcttc 660
L N N G G S I R N V L D V G C G V A S F
ggagcttatcttctcacacgacatcatagccatgtctcttgctcctaataatgatgccac 720
G A Y L L S H D I I A M S L A P N D V H
cagaaccagatccagtttgctctagaacgagggatcccatcaacacttgggtgttcttggg 780
Q N Q I Q F A L E R G I P S T L G V L G
actaagcggcctccataccaagcagatcgtttgaacttgctcactgctctagatgtcgg 840
T K R L P Y P S R S F E L A H C S R C R
atagattggcctcaaagagatgggatcttgttgctggaacttgataggctgctcagacct 900
I D W L Q R D G I L L L E L D R L L R P
ggcggttactttgtatactcgctcccctgaagcttacgcacacgacccagaaaacagaaag 960
G G Y F V Y S S P E A Y A H D P E N R K
attgggactgcatgatctcttcaggagaatgtgttgagggttggccaaacga 1020
I G T A M H D L F R R M C W R V V A K R
gaccaatctgttatatggggaaaaccgatatccaacagctgttacttgaagaggggtcca 1080
D Q S V I W G K P I S N S C Y L K R G P
ggtgtccaacctccgcttcttgcttctggagatgaccagatgcaacttggaaacgtttcc 1140
G V Q P P L C P S G D D P D A T W N V S
atgaaagcttgcataacaccgtactcagtgaggatgcataaagaaagatggagtggtt 1200
M K A C I T P Y S V R M H K E R W S G L
gttccctggccacggagactgacagctcctccaccacgtcttgaagaaatcggtgtcact 1260
V P W P R R L T A P P P R L E E I G V T
cccgagcaattccgtgaagatacggaaacatggcggcatagagtgatggaataactggaag 1320
P E Q F R E D T E T W R H R V M E Y W K
ctgcttaaaccaatggtgcaaaagaactctattagaaacgtgatggacatgagctcaaac 1380
L L K P M V Q K N S I R N V M D M S S N
ctcggcggttttgcagctgctctaaacgataaagatgtatgggtaatgaacgtcataccc 1440
L G G F A A A L N D K D V W V M N V I P
gtacaatccaaccgagaatgaagatcatttacgaccgtggccttatcggagccactcat 1500
V Q S Q P R M K I I Y D R G L I G A T H

GAGTTGATTTAGAGAATATGAAGGAGAAGGTGTA AAAACCCAGCCAGCCAAAGTTGTGGGATGGCCACCGGTACGATCTTT
CCGGAAGAAAGTCATGTCAGGCCAAAAGCCAAACCGCTGGAGATGCCACCGAAGGAACGGAAAAAGACTTCCAGCAGCAACGGAGCC
ACCTCCTCTGCOGCAGCTTACGTGAAGGTTAGCATGGAOCCGOCACCGTACCTAAGAAAAATTGATTTGAAACTTTACAAAACAT
ATCAAGACCTCTCCGACGCTTAAGCAAATGTTGAGCTCTTTACCCAGGCAACTATGGACCACAAGGAATGAAAGATTTTAT
GAAOGAGAGTAGGTTGATCGATCTTTTGAOCCGATCAGATTAOCTTCAACTTATGAAGATAAAGATGGAGACTGGATGCTTGTA
GGAGAOGTACCGTGGGGGATGTTTGTGATTCATGCAAAOCCATAAGAATAATGAAGGGATCAGAAGCAATCGACTTGCCTCAA
GGCATTAGAAAAGTGAAGAACAGAAAGCTGAGAGCTCTAAGAAAAATGACCGGTTGATCCGGTTGGATATCTCAAACCGAGAAA
AGCCAAACCGGCTOGAACTACTGTTAOCGAGCAGGGAGTTTGGGTATAATATTCATAAATAATAATTAATATTGTGGTGTATTAC
ATTTTATAAACTCAAACCCCTTTTGTATATGTATAATATTATATACATATATGAATATGTATATTAGGTGGCATCTATGTATTT
CCGCTTTGAACACCTTTTGTTTTAOCCATTATTGTATTGTCTATATGGTTACGTATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGAGGCCATA
AGGGCC

atgatcaattttgaggcgacggagctgaggttagggctgccgggtggcaatcacggagga 60
M I N F E A T E L R L G L P G G N H G G
gacatggccatgaaaaataatgggaaacgaggatttctgagaccgttgatctcaaactg 120
D M A M K N N G K R G F S E T V D L K L
aatctttcatccacggctttggattcggttccggagttgatttagagaatatgaaggag 180
N L S S T A L D S V S G V D L E N M K E
aaggtcgtaaaaccaccagccaaggcacaagttgtgggatggccaccggtagcatcttc 240
K V V K P P A K A Q V V G W P P V R S F
cggaagaacgtcatgtcaggccaaaagccaaccgctggagatgccaccgaaggaacggaa 300
R K N V M S G Q K P T A G D A T E G T E
aagacttccagcagcaacggagccacctcctctgccgcagcttacgtgaaggtagcatg 360
K T S S S N G A T S S A A A Y V K V S M
gacggcgcaccgtacctaaagaaaaattgattgaaactttacaaaacatatcaagacctc 420
D G A P Y L R K I D L K L Y K T Y Q D L
tccgacgccttaagcaaaatgtcagctctttaccctaggcaactatggaccacaagga 480
S D A L S K M F S S F T L G N Y G P Q G
atgaaagattttatgaacgagagtaggttgatcgatctttgaaacggatcagattacgtt 540
M K D F M N E S R L I D L L N G S D Y V
ccaacttatgaagataaagatggagactggatgctttaggagacgtaccgtgggggatg 600
P T Y E D K D G D W M L V G D V P W G M
tttgattcatgcaaacgcataagaataatgaagggatcagaagcaatcgacttgct 660
F V D S C K R I R I M K G S E A I G L A
ccaagggcattagaaaagtgaagaacagaagc 693
P R A L E K C K N R S

>S-57(Stem) EU186375

GGCCAAATCGGCCATCACGAACTAAAAACCCATTAACGAAAGATGTCATTGGCTTCACTTACCTATTAGTGTATCAGGATTCTTAAT
CCATCTTCTTCTTCCACAACCTTGGTGGTCTTTCAGATTCTCAACGATTAAGCCATGTGTCTTGGTGGTCCAGATGTTCTCAGGCAG
AAGGTCCATTGAGAAGACCTCTGCTCTCTACTCTOCCGAGCCCTCACTCCGAAAAGCCCTGTTCTCTCTGTACCGTGGTCT
TTCTCTCTCTCATCCCGCCCTGCAGAAAACGGTGGCTGTTGATGGTAAGGGTGTAGTTAAGGTGGAGTTTCAGAGACAGAAG
GCTAAAGAGCTTCAGGAATACTTTAAGCAGAAGAAGCTTGAAGCTGCTGGTCAAGGTCCCTTCTTTGGTTTCCAAACAAAAACG
AGATCTCCAATGGAAGGTGGGCTATGTTTGGTTTCCGGTTGGAATGCTTACAGAGTATGCAACAGGCTCAGACCTTGTGACCA
AGTTAAAATCCTTCTCTCCAACCTCGGAATTATAGACTTGAATAACAAAAGTTTTGTTAATTGGTCTTCTGTGTATGCATCTC
TAAAGATCTTCAATACATGACCATTTGTGTATTCAOCCACTTTTATCTTCAAGTCATATAATTATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAC

>S-59(Stem) EU186377

GGCCAAATCGGCCATCAGGAACTCAGAAAAGCAGAGAACTTTATTCTCTCTCTAACTCTCAACTTCTGCTGGATCTCTOCAG
CAGAOCGAAGATCTTCTTOGGAGAGATTCTTAGGGGACCGAOCATCTATOGATCAAGGCTTCTCGGGCAACAGAAAGTGCAGAA
ATGGACCAOCGACAAGACAGGATGOCAAAGGOCACCOGAGGGTTOCAAGCTATGCATCAACAACCTGCGGTTTCTTOGGAAGCGCTG
CCACAATGAACATGTGTTCCAAGTGCCACAAGACTATCTTGTTTCAACAGGAACAGGGGGCCAAAGCTTGCATCTGCAGTGTCTGG
ATCAOCCAGCAACATCTAAAGGAAACCTTCACTGCTGCTTTGGTTGATGCTGAAAACCAATOCATOGAGCOCTGTGGCTGTCTCT
GTACAAGCTGTTGCAGAGGTAGTAGCACCCAGAAGAAGCTGCAGCAAAAACCTAAGGAAGGGGCCAGCOGATGCACACTCTTGCACA
AGOGGGTTGGTTGACTGGATTCAATGTGCTGTGGTGAOCTCTTCTGTGGTAOCGACCOGCTATGCAGACGTGCACAACCTGCTC
TTTOGATTACCATGTTGCTGCGCAAGAAGCTATAGCCAAAGCAAAOCCGGTTGTGAAGGCAGATAAGCTTGACAAGATCTGAAAC
TCAGAAACTCTGTTTCTTCTCATGTGCTGTGGTTCAAGCGTGTGTTGATCTGTAGCTTCTCOGTTCTCTGOCAGTAT
CTGTGGTGTGAAAACCTTCTATATATCTGTGTTTGAAGCAGAGAAGTGTGCTCTTAAATATATATATATGCTTTGATGTGTT
TCTCTTTTTTTTTTAATATTATTTATGAGCACTATGGTTTGGTTATGTTTACTCCTTTGGGTCTGTATCATATTGAGATTGTAA
CTTTAGCTATATGAAGATTTTTCTTAAAAGCTTATGCTTGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGAGGCCATAAGGGCC
atggaccacgcacaagacaggatgccaaagcccacccgaggggtccaagctatgcatcaac 60
M D H D K T G C Q S P P E G P K L C I N
aactgcggtttcttcggaagcgctgccacaatgaacatgtgttccaagtgccacaagact 120
N C G F F G S A A T M N M C S K C H K T
atcttgtttcaacaggaacagggggccaagcttgcacatctgcagtgctgtggatcaccagc 180
I L F Q Q E Q G A K L A S A V S G S P S
aacatcctaaaggaacacctcactgctgcttgggtgatgctgaaaccaaatccatcgag 240
N I L K E T F T A A L V D A E T K S I E
cctgtggctgtctctgtacaagctgttgagaggttagtagcaccagaagaagctgcagca 300
P V A V S V Q A V A E V V A P E E A A A
aaacctaaggaagggcccagccgatgcactactgcaacaagcgggttggttgactgga 360
K P K E G P S R C T T C N K R V G L T G
ttcaaatgtcgtgtggtgacctctctgtggtacgcaccgctatgcagacgtgcacaac 420
F K C R C G D L F C G T H R Y A D V H N
tgctctttcgattaccatgttgctgcgcaagaagctatagccaaagcaaaccgggttg 480
C S F D Y H V A A Q E A I A K A N P V V
aaggcagataagcttgacaagatc 504
K A D K L D K I

>S-65(Flower) EU186335

GGCCAAATCGGCCATCAGGATCAATCACACAACAAGCGTTGAGAGAAGAAAAGAAAAGOGATAAAAAGCGAGAAGCOCTAAGAAAC
ATCAAAAAGACAAGAAAAACAATTTTATTTTTOGTTTTATCAAGAACATCTTTGAATTTTATGGCAGOOOCTOCTCOGAAACAAA
CTTTATCOGTGTOCTTACCGTTTCTCOGCTTTGAACOOOGTGGGTGAGOOCAOOGTGAOOGCTTCAACOGCOGTGTOOOGGAG
ATACTCTOCTTOGGACAACAAGOGGOCAGAGOOOCTGTCCACCAOCCAAAACCAAGCTCAOCCATGACATOGATCTGTCCG
ACCAAGOOOGTCTCTTTGCOCTCTGTCCCAOCTCOGAOCTTCTCOGCTOCCOOGTGTGATGOGGGOGGOGATAGGTCCGAT
GGTGGATCTTGGATOGTGGGTGATGAGTTCTAAACTCATGGAACOOOGTTAACACGTGACATGGTCTTGGACTTGTGAAAAGT
ACGTTTTATGAOCCATTTCTGOGCOOGTGAAGAOGCTGAOCGACOOOGGOCAGOCGTAAGAAGTGTTTACGAGGCTACGGGTCTTA
AAGGTATGCTTGTGTACGGOGTTGAACAOCOOGATGATGCTGCOCTCTTGTGATGATAACATGCACCATTTCTTGAOCCATTGA
AGCTGOCAAATOGTTAOCACATCTCACTTTAGCTCAGTGGTGTGGAAGATAAOCOGOGATTTGTCCATTAGTCTTCTAAAACGA
GTGAGTGATTTGCTTOGGTGGGAATACAAGACTAAGAACCTCAAACCTCATGGAAGCTCAAATOGTTTCCGGTTTTCTCOGATT
CAAGOOCTCTTTAOCACACAACCTCAGAAOOGGAOCCTTAAOOCOOGAAGAAGAAOOGGGAGCTOGAAGCAGOOOACGTAAAGAT
CCAAGACATCTGCOGGAAATGOCAGAATOCAAOGTACCTTTGCTGGTGGATGCTGAAGACACAATCTOCCAAOOCOGOGATOGAC
TACATGGCGTACTCATCAGCGATCTTGTTCAATGOGGACAAGACAGAOCCAATTGTTTACAACAOGATTCAGGOCTACTTGAAG

ACGCTGGTGAGAGGTTGCATTTGGCOGTACAAGAAGCOGAGAAGGAAAATGTTCTATGGGGTTAAGTTGGTGAGAGGTGCTTA
TATGTCTAGTGAAGCTAGGCTGGCAGATTCTTGGGGCACAAAGTCAACCAGTCCACGACACAATTTCAGAAACCGCACGATTGCTAC
AATAACTGCATGAOCTTCTAATGGAGAAAGCOCTCAAACGGTTGCGGGCTTGGGTGTGGTTCTTGCAACACATAACGCTGATTCTG
GGAGACTTGCATCAAAGAAAGCAAGTGAACCTCAATATOGATAAAGAGAAACGGGAAGATAGAGTTTGGCAGCTATAACGGTATGTC
AGATGCATTGTCTTGGTTAAAGAGAGCOGGGTTCAATGTTAGCAAGTACATGCCATTCCGACCGGTGAAAACCGCTATAACCG
TATCTTGTCCGACGTGCTTATGAGAACCGGGGAATGATGGOCACGGGAGOCCTGAOCTCATCTCATGAGGATGGAACATAAAGA
GGAGATTACTGCOGGAAATGCGTGAAGGAGATGAGTTAATTGTCTTATGTATGGAGCCATTAATGAACTGGGAAATGTTGA
TCAACAAATTTGTTCTATGTAGATTATAAGAAAAATATATTAACGTAAGTAGGTAAGAACATTTTCATCTGGTTTTGTTGTAAGGGG
GATAAATATTTAATTAATCATTCAATGTATATTCACCCCTTCTTATCAATAATAATGGAATTGCOCTTTTTATTACTAAAA
AAAAAAAAAAAAATACGGGCCATAAGGGCC

atggcagcccgctcctccgaacaaactttatccgctcgtccttaccgtttctccgctttg 60
M A A R L L R T N F I R R P Y R F S A L
aaccgggtgggtcagcccaccgtgaccgcttcaaccgccgtcgtcccggagataactctcc 120
N P V G Q P T V T A S T A V V P E I L S
ttcggacaacaagcgcagagccgcctgtccaccacccaaaaccaaacgaagctcacat 180
F G Q Q A P E P P V H H P K P N E A H H
gacatcgatctgtccgaccaagcccgtctctttgcctctgtccccacctccgacctctc 240
D I D L S D Q A R L F A S V P T S D L L
cgctccaccgcccgtgctgcatgcgggcgataggtccgatggtggatcttggatcgtgg 300
R S T A V L H A A A I G P M V D L G S W
gtcatgagttctaaactcatggaaaccgcttaacacgtgacatggtccttggacttgtg 360
V M S S K L M E T A L T R D M V L G L V
aaaagtacgttttatgaccatttctgcccgggtgaagacgctgacgcagccgcgagcgc 420
K S T F Y D H F C A G E D A D A A A Q R
gtaagaagtgtttacgaggctacgggtcttaagggtatgcttgtgtacggcgttgaacac 480
V R S V Y E A T G L K G M L V Y G V E H
gccgatgatgctgcctcttgtgatgataacatgcaccatttccctcgaaccattgaagct 540
A D D A A S C D D N M H H F L R T I E A
gccaaatcgttaccaacatctcactttagctcagtggtcgtgaagataaccgcgatttgt 600
A K S L P T S H F S S V V V K I T A I C
cccattagcttctaaaacgagtgagtgatttgcctcgggtgggaatacaagactaagaac 660
P I S L L K R V S D L L R W E Y K T K N
ttcaaacctctcatggaagctcaaactcgtttccggttttctccgattcaagccctctttac 720
F K L S W K L K S F P V F S D S S P L Y
cacacaaactcagaaccggaacccttaaccgcccgaagaagaacgggagctcgaagcagcc 780
H T N S E P E P L T A E E E R E L E A A
cacgtaaggatccaagacatctgccggaatgccaagaatccaacgtacctttgctggtc 840
H V R I Q D I C R K C Q E S N V P L L V
gatgctgaagacacaatcctccaaccgcatcactacatggcgtactcatcagcgcgac 900
D A E D T I L Q P A I D Y M A Y S S A I
ttgttcaatgcgacaaagacagaccaattgtttacaacacgattcaggcctacttgaga 960
L F N A D K D R P I V Y N T I Q A Y L R
gacgctgggtgagaggttgcatttggccgtacaagaagccgagaaggaaaatgttctatg 1020
D A G E R L H L A V Q E A E K E N V P M

gggttaagtgggtgagaggtgcttatatgtctagtaggaagctaggctggcagattccttg 1080
G F K L V R G A Y M S S E A R L A D S L
gggcacaagtcaccagtcaccgacacaattcagaacacgcacgattgctacaataactgc 1140
G H K S P V H D T I Q N T H D C Y N N C
atgaccttctaataaggagaaagcctcaaacgggttcgggcttcgggtggttcttgcaaca 1200
M T F L M E K A S N G S G F G V V L A T
cataacgctgattctgggagacttgcatacaagaagaagcaagtgaactcaatatcgataaa 1260
H N A D S G R L A S K K A S E L N I D K
gagaacgggaagatagagtttgcgcagctatacggatgtcagatgcattgtccttcgggt 1320
E N G K I E F A Q L Y G M S D A L S F G
ttaaagagagccgggttcaatgtagcaagtacatgccattcggaccgggtcgaaaccgct 1380
L K R A G F N V S K Y M P F G P V E T A
ataccgtatcttgcggacgtgcttatgagaaccggggaatgatggccacgggagccact 1440
I P Y L V R R A Y E N R G M M A T G A T
gaccgtcatctcatgaggatggaactaaagaggagattactcgccggaaatgcg 1494
D R H L M R M E L K R R L L A G N A

>S-66(Flower) EU186336

GGCCAAATCGGCCATCACGAGTATCTTCTCACTGGAATTGGAATTGTCTCTCAACAGATTGCGAGTCTGAAAAATCATCAGGGG
TGTGGATAATGGCTCTATCACGCTCTCATOGGATCTAACATCATCTCAOGCCOCTCTOOGCOGCTTCCOOGCTTCCATCTC
AACCGACACCACACCGATCACAAATCGAGACCTOGCTTCTTCAOCCGCTCAOCTATGCGAOCACCOCTCTOGCTOOGTGAATCC
TOCACCCAGAGCTOCTCTOCTTCTTCCGACCATGGCTCTGATGCGOCCATGGAGATGCGOCCGACTOCTTTACAAGCGA
AACTAATCGAGGGTCTTCCOACTCTAOCGAGGOCAGGAAGCOGTTGGOCATOGGGATGGAGGCOGOGATCAOAGAAGGACCGC
CATCATCAGGCOCTAOCGOGACCACTGCATCTTCTGGGCOGOGGGGGGTGGCTGTAOGAGGTGTTGOGGAGCTTATGGGGAGG
CAAGACGGCTGCTCGAGAGGGAAAGGTGGGTGATGCATTCTATAAGAAGGATTGCTGTTCTACGGTGGGCATGGGATCGTGG
GTCCTCAGGTTCCGTTAGGCTGTGGGATTGCTTTCCGOCAGAAGTATTOCAAGGAGGAGGGGGTGAOGTTGCTATGTATGGOGA
TGGTGCCTGCCAATCAAGGGCAGCTTTTTGAAGCTTTGAATATCTCTGCTCTTTGGGATTTGCTTCCATTCTOGTCTGOGAGAAC
AATCACTATGGGATGGGAACTGCTGAGTGGAGAGCTGOCAGAGCOCTTCTACTATAAGOGTGGTGATTATGTTCTGGTTTGA
AGGTAGATGGTATGGATGCGTTTGTGTCAAACAAGCTTGCAAATTTGCTAAGGAACATGCOCTTGAAGAATGGACOGATAATTCT
TGAGATGGACAOGTACAGGTACCAOAGGTCCTCTATGTOGACCOCTGGGAGCACATAOOGTACAGAGATGAGATATCTGGTGTG
AGACAGGAAAGAGATCCAATTGAGAGAATTAAGAAAGCTGGTACTATCTCATGACCTAGCAACOGAGAAGGAGCTTAAGGACATGG
AGAAGGAAATTAGGAAAGAAGTAGATGAOGCTATTGOCAAAGCTAAGGATTGOCOAATGOCAGAGCOCTTCTGAGCTTTTTACCA
TGTGTATGTGAAGGGATTTGGCACCGAGTCATTTGGAGCTGACAGAAAAGAGTCAAAGCTGCACCTCCATGAAGCTCTTGTTCG
TTAAACOGCACOGTGGTTTGATAGGAAGOCATGAATAAAAATGTTTTTTTTGGGCAGAGTGTTTTGTGCTCTGTTCAAGGCOGC
CTTTGOGAGTTTTAATTTCTAAGTATCTTTACATACATAAAGAGCATCATGTGATTCTTGTGAACCTTGTGTGTGTGATTTA
AGTTTGTCTCOGAGTGTCTOGATACAAOAAAAATTTGAAATAAGTTTTAATAGAGTCCCTTGTCTATCAAAAAAAAAAAAA
AAATACGGGCCATAAGGGCC

atggctctatcacgcctctcatcgcatctaacatcatctcacgccccctctccgccc 60
M A L S R L S S R S N I I S R P L S A A
ttccgccgttccatctcaaccgacaccacaccgatcacaatcgagacctcgcttccttc 120
F R R S I S T D T T P I T I E T S L P F
accgctcacctatgcgaccaccctctcgctccgtcgaatcctccaccaagagctcctc 180
T A H L C D P P S R S V E S S T Q E L L
tccttcttccgcacatggctctgatgcgcccgatggagatcgccgcccgactcgctttac 240
S F F R T M A L M R R M E I A A D S L Y
aaagcgaaactaatccgaggggttctgccacctctacgacggccaggaagccgtggccatc 300

K A K L I R G F C H L Y D G Q E A V A I
 gggatggaggccgcatcacgaagaaggacgccatcatcacggcctaccgcgaccactgc 360
 G M E A A I T K K D A I I T A Y R D H C
 atcttctctgggcccgggggggtcgctgtacgaggtgttcgcgaggcttatggggaggcaa 420
 I F L G R G G S L Y E V F A E L M G R Q
 gacggctgctcgagaggggaaaggtgggtcgatgcatttctataagaaggattcgctcgttc 480
 D G C S R G K G G S M H F Y K K D S S F
 tacgggtgggcatgggatcgctcggtgctcaggttccgttaggctgtgggattgctttcgcg 540
 Y G G H G I V G A Q V P L G C G I A F A
 cagaagtattccaaggaggaggcggtgacgttcgctatgtatggcgatgggtgctgccaat 600
 Q K Y S K E E A V T F A M Y G D G A A N
 caagggcagcttttgaagctttgaatatctctgctctttgggatttgccttccattctc 660
 Q G Q L F E A L N I S A L W D L P S I L
 gtctgcgagaacaatcactatgggatgggaactgctgagtggagagctgccaagagccct 720
 V C E N N H Y G M G T A E W R A A K S P
 tcttactataagcgtggtgattatgttctctggttgaaggtagatggatggatgcggtt 780
 S Y Y K R G D Y V P G L K V D G M D A F
 gctgtcaaacaagcttgcaaatttgctaaggaacatgcctgaagaatggaccgataatt 840
 A V K Q A C K F A K E H A L K N G P I I
 cttgagatggacacgtacaggtaccacggctactctatgtccgaccctgggagcacatac 900
 L E M D T Y R Y H G H S M S D P G S T Y
 cgtaccagagatgagatatctggtgtgagacaggaaagagatccaattgagagaattaa 960
 R T R D E I S G V R Q E R D P I E R I K
 aagctggtactatctcatgacctagcaaccgagaaggagcttaaggacatggagaaggaa 1020
 K L V L S H D L A T E K E L K D M E K E
 attaggaaagaagtagatgacgctattgccaaagctaaggattgcccaatgccagagcct 1080
 I R K E V D D A I A K A K D C P M P E P
 tctgagctttttaccaatgtgtatgtgaagggatttggcaccgagtcatttggagctgac 1140
 S E L F T N V Y V K G F G T E S F G A D
 agaaaagaagtcaaagctgcacttcca 1167
 R K E V K A A L P

>S-70(Stem) EU186378

GGCCAAATCGGCATCACTGAGCGCTGAAGATTTTCAGAAGAAGTTTTCGATCAGAGACTOCTOCTCGOCCGAGAAATGGAAT
 CGAATGCGGGGGTCTAGTAGCTOACGGTTGGTTGTCTCGAACTCTGGTTTTGCTTCGGAGACTGCTTGAGATTCAGGAGOGT
 CGAGCACAGGCOCTAOCGCAAACTCAAAAAGAGGGTTCTCAGAGTATGTGGAGACTAGTGGTGAAGOGCTTTATCAGAAGCTGTGCA
 GOGAGATTACTGCTGAGTTCAACGAGTGTCTAAACAAGTGOOGGAAATGGAACTCTGTTTCTGAATCTGACGTTGGAAGATC
 GGATCTTGCTCAACTGCTCAGCGACATTCAAACTCAGGAGAAGCAGAAATTCATCTGAOCGTTACAATACAGGTACTGAAAGAAG
 GCAGGGAGGCOGTCAGAACGAATGCTGACACACGAGAAGTCAAGTTCAAGAAAACCAATGCAGCACGAGTGTGTGCATCTTCATG
 AGATCACAGAAGCTGAAGGAACAGAGGAAGCAGAAGCTGATGCAGAGTTTGACAOCGCTTTGAAGGAAGTAATTAGAGGAGTGCA
 AGAOCGCTGTGACTTGCATCAATGAGTATTTGGAAGACGTTAGGTACGAGATTGCAGOOCTTGAAGCTGATTAGTTGTTATCAATC
 TCATCACTTCTTTAOCCTTCTACAGTTAACTTGTGTGTTTAAAGCTGTGGCTAATTAGCTTAAGATATTTAGAACTCAAAA
 GTTATGATATTTCTGTTGTCAAGTTATCTATGTTGATTACTGTGGGTAATGACTACAATCACAGCAATTTCAATTATTTAAACA
 CATATTTGATTTGAAACATTGATTTAAGAGGACTTGTACAATATATAGTATTGCAAAAAAAAAAAAACTGAGGCATAAGGGCC

atggaatcgaatgcggcgggtctagtagctccacggttggtcgtctcgaactctggtt 60
 M E I E C G G S S S S T V G S S R T L V
 ttgcttcggagactgcttgagattcaggagcgtcgagcacaggcctacgccaaactcaaa 120
 L L R R L L E I Q E R R A Q A Y A K L K
 agagggttctcagagtatgtggagactagtgggaagcgccttatcagaagctgtgcagc 180
 R G F S E Y V E T S G E A L Y Q K L C S
 gagattactgctgagttcaacgagtggttctaacaagtgcgcgaaatggaaactctgttt 240
 E I T A E F N E C S K Q V R E M E T L F
 ctgaatcctgacgttgaagatcggatccttgctcaactgctcagcgcacattcaaactcag 300
 L N P D V G R S D L A Q L L S D I Q T Q
 gagaagcagaaattgcatctgacggttacaatacaggactgaagaaggcagggaggccg 360
 E K Q K L H L T V T I Q V L K K A G R P
 tcagaacgaatgctgacacacgagaactgcaagttcaagaaaccaatgcagcagcagtggt 420
 S E R M L T H E N C K F K K P M Q H E C
 gtgcatcttcatgagatcacagaagctgaaggaacagaggaagcagaagctgatgcagag 480
 V H L H E I T E A E G T E E A E A D A E
 tttgacaacgcttgaaggaagtaattagaggagtgaagacgctgtgacttgcacatcaat 540
 F D N A L K E V I R G V Q D A V T C I N
 gagtatttgaagacgttaggtacgagattgcagcccttgaagctgat 588
 E Y L E D V R Y E I A A L E A D

>S-71(Flower) EU186338

GGCCAAATCGGCCATCACGACCTTTCCTCTCTCACCTGCAATCAAACGGTTACTTTCCTTTTTAAAAOCCGTGACTTCAAATC
 TGAACCCCTTCCCCAGAGATTGGTAGATGGAGITTTGAATOGITTTCTAGTGTCTTAGGGACGTCAGCAGTCATCTTCGTGGTGCT
 CATGCTCTCTTCACTGGCTCTCTOGTAGAACCAGGTAAGGTTTGGGTTTATTACCCGAAOCCGATCTGAAAGGAATGGATCCA
 TGGGAAGGCAGCTCCTTGAACCGAAACCCATTTGCTGGATCCGGAAGCTTTCACCTTCCACCGAACAAGAGCTGGTTAAGCTGT
 CCGGGGTGATACCGCGCTCACTTCTCTTCTGAGCACTGTTCTTGGGATATTGCTTTGTGGGCTCTTCTCTCTTGGGAC
 TCTACTOCTTTATCCGCTACTGACAACAGCTTAAAGAOCCTCAAGGAAGCTCACTGACAACCAAGTAAOCCGAAOCTTTAGCCAA
 CTTGATAATCTATCTATGGCTAACATCACTAGAAGGAGITTCAGGCTGTGGGGGTTCCTAGGAGCGGTTTACTGGGTATCTCTAG
 TCACATATTTTCATGTTATGGAAAGCTTACAAGCACGCTGCTGCACTGAGAGCTGAAGCTCTGATGTCTAGTGAAGAAGTATTACC
 AGAGCAATAAGCTATTCTOGTTAGGGATATAOCTTCCOCCACTAOCGAGAGAGCGCAGAAAGAGITTCGTGGATTCTTACTTTCAGA
 GAAATCTAOCAGAGACATTCTACAGATOCTTGTGTAAACAGAAAACAGCAAGATTAATAAGATATGGGAAAACCTTGAAGGCT
 ACAAGAAGAAGCTGGCGCGCAGAAAGGGTCTTTGCAGCCACAGTAACCGGCCAATGAACAAAACCGGCTTCTCTGGGCTAGT
 GGGAGAGCGAGTAGACAGCATTGACTATTACAAAAGCTGATCAOAGTCTGTAGCCAACTAGAAGCAGAACAAAGAAGCGTT
 CTGGCGGAGAAGCAGCAAAOCCGAGCGGTTGTGTTCTTCAOCCGACGCTGCTGAGCTCTAGCTGCTCAGTCACTACTGOC
 AGATGGTTGATAAATGGAAGGTGACCGAAGCTCCOCCAGCTCCTCTGGGAGAATCTCAAGATCAAGTCTTTCAGCAG
 AATAGTCAGACAGTACTTGTATCTACTTCTCTGTTGOGATAACTATATTGTTCTACATGATCCCTATAGOGTTTGTCTCTGOGATC
 ACCACTCTTGGGAATCTCCAGAAGGCTCTTCCCTTCAATTAACCGATOGTGGAGATTGCTTTTATAAGAACCATCTTGCAGTCTT
 ACCTTCTCAGATTGOGCTCATTGTCTTCTTGGOGATGCTTCTAAGTCTCTCATGTTCTTATCCAAGTCAGAAGGGATTCTTTC
 GCAGAGTCATGCTATTAGAGCTGCTCCGGGAAGTACTTTTACTTCTOGGTGTTGAATGTCTTATOGGTGTGACACTTGCAGGG
 TCTTTGTTTGATAACTTGAAGGCTCTGAGAOCGAAACCACTOCCATCGOGTACCGTITGGCTACTAGTCTCCCTAAGAAGCGTA
 CTTTCTTCTTGCATACGTTGCTCTCAAGTCTTTGTTGGTTATGGTCTTGTAGCTGTCTAGGATCATACCGTTGATAATATCCA
 TTTGAAAAGAAGTATCTATGCAAACTGAAGCCAGGTCAAAAGAAGCTTGGTATCCAGGAGACTTGAGCTACCGGACTAGGGTT
 OCTAGOGACATGCTCATOCTCACCATCAOCTTCTGCTACTCCGTAATOGCTOCTTTGATCCTOGTGTGGTGTATCTACTTTG
 GTTTAGGTTGGCTCATOCTAAGGAACCGGTTGAAAGTGTATGTTCCATOGTACGAGAGCTAOCGGGAGGATGTGGCCGATAT
 TCACACCCGCATACTAGOGGGTGTGTTCTGTTCACTGGTTATGTTGGTTACTTGGGAGCCAAAGCTATTCGTTGGGOGACT

CTTTTGGTTCCTCTCATATTCATCTCTCTCATCTTCGGTTACGTGTGCOGTGTCAGAAATTCACAAAGGGTTOGAACACACGGGCTC
 TAGAGGTGGCTTGCOGGGGGGCTGAAGCAGAGACCGGACCTCGAGGAGGTTTTTCAGAGOGTACATTCOGTATAGCTTGAGCACTCA
 CAAAGGAGATGATCACCAGTTCAAAGGAGCAATGTCTOGTTACCAAGACTATGCTGCTATATCAGCTGCTTAAGATTTGAATCCT
 CTCCACAGATTTGTTTTGTTTGTCTAGAAAGCTTTTTTTTTTTAATTATTGTGTGTGATTCTAGAGTTTGTITAGGA
 TTTTTTGGTTGTATGTGTTGTTGGTTGTTGTAACCTGTAACCATGTAAGCTAOCCTATTAATTATCAACTTATCAGTGTTOGT
 CAAAAAAAAAAAAAAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAATACGGGCCATAAGGGGC
 atggagtttgaatcgtttctagtgtccttagggacgtcagcagtcacatcttcgtggtgctc 60
 M E F E S F L V S L G T S A V I F V V L
 atgctcctcttcacctggctctctcgtagaccggtaacgtttcggttattaccggaac 120
 M L L F T W L S R R P G N V S V Y Y P N
 cggatcctgaaaggaatggatccatgggaagcagctccttgaccgaaaccattgccc 180
 R I L K G M D P W E G S S L T R N P F A
 tggatccgcaagcttccactccaccgaacaagacgtcgtaagctgtccggcgctgat 240
 W I R E A F T S T E Q D V V K L S G V D
 accgccgtctactctgcttcttgagcactgttcttgggatatttgcttgcggctctt 300
 T A V Y F V F L S T V L G I F A L S A L
 cttcttggccgactctactcccttatccgctactgacaacagcttaaagacctcaagg 360
 L L L P T L L P L S A T D N S L K T S R
 aacgtcactgacaccacaagtaacggaaccttagccaactgataatctatctatggct 420
 N V T D T T S N G T F S Q L D N L S M A
 aacatcactagaaggagttcaaggctgtgggcttccctaggagcggttactgggtatct 480
 N I T R R S S R L W A F L G A V Y W V S
 ctagtacatatttcatgttatggaaagcttacaagcacgtcgctgcactgagagctgaa 540
 L V T Y F M L W K A Y K H V A A L R A E
 gctctgatgtctagtgaagaagtattaccagagcaatacgtattctcgttagggatata 600
 A L M S S E E V L P E Q Y A I L V R D I
 cttccccacctaacggagagacgcagaaaagagttcgtggattcttacttcagagaaatc 660
 P S P P N G E T Q K E F V D S Y F R E I
 taccagagacattctacagatccctgtcgtaacagaaaacagcaagattaataagata 720
 Y P E T F Y R S L V V T E N S K I N K I
 tgggaaaacttgaaggctacaagaagaagctcgcgcgcgagaaagcggcttcttcgagcc 780
 W E N L E G Y K K K L A R A E A V F A A
 accagtaaccggccaatgaacaaaaccggcttgcctgggctagtgggagagcgagtagac 840
 T S N R P M N K T G L L G L V G E R V D
 agcattgactattacacaaagctgatcaacgagctctgtagccaaactagaagcagaacaa 900
 S I D Y Y T K L I N E S V A K L E A E Q
 agaacggttctcgccgagaagcagcaaacggcagcggttgtgttcttcacggaccgtgctc 960
 R T V L A E K Q Q T A A V V F F T D R V
 actgcagctctagctgctcagtcactacactgccagatgggtgataaatggacggtgacc 1020
 T A A L A A Q S L H C Q M V D K W T V T
 gaagctcccagacctcgccagctcatctgggagaatctcaagatcaagttcttcagcaga 1080
 E A P E P R Q L I W E N L K I K F F S R
 atagtcagacagtacttgatctacttctcgttgcgataactatattgttctacatgatc 1140

I V R Q Y L I Y F L V A I T I L F Y M I
 cctatagcgtttgtctctgcgatcaccactcttggaatctccagaaggctcttcccttc 1200
 P I A F V S A I T T L G N L Q K A L P F
 attaaaccgatcgtggagattgctttataagaaccatcttgagctttaccttccctcag 1260
 I K P I V E I A F I R T I L Q S Y L P Q
 attgcgctcattgtcttcttgcgatgcttctaagttcctcatgttcttatccaagtca 1320
 I A L I V F L A M L P K F L M F L S K S
 gaagggattccttcgcagagtcagctattagagctgcctccgggaagacttttacttc 1380
 E G I P S Q S H A I R A A S G K Y F Y F
 tcggtgttgatgtcttcatcggtgtgacactgcagggctttgtttgataacttgaag 1440
 S V L N V F I G V T L A G S L F D N L K
 gctctgagacgaaaccaaactcccatcgcgtaccggttggtactagctctccctaagaac 1500
 A L R R N Q T P I A Y R L A T S L P K N
 gctactttcttctgacatacgttgctctcaagttcttgggttatggcttgagctg 1560
 A T F F L T Y V A L K F F V G Y G L E L
 tctaggatcataccgttgataatattccattgaaaaagaagtatctatgcaaaactgaa 1620
 S R I I P L I I F H L K K K Y L C K T E
 gccgaggtcaaagaagcttggtatccaggagacttgagctacgcgactagggctcctagc 1680
 A E V K E A W Y P G D L S Y A T R V P S
 gacatgctcatcctcaccatcaccttctgctactccgtaatcgctcctttgatcctcgtg 1740
 D M L I L T I T F C Y S V I A P L I L V
 ttcggtgttatctactttgggttaggttggtcctcctaaggaaccagggcgttgaaagtg 1800
 F G V I Y F G L G W L I L R N Q A L K V
 tatgttccatcgtacgagagctacgggaggatgtggccgcatattcacaccgcatacta 1860
 Y V P S Y E S Y G R M W P H I H T R I L
 gcggcgttgttctgtttcaactgggtatgtttgggtacttgggagccaagctattcgtt 1920
 A A L F L F Q L V M F G Y L G A K L F V
 tgggcgactctttgggtcctctcatattcatctctctcatcttgcggttacgtgtgccgt 1980
 W A T L L V P L I F I S L I F G Y V C R
 cagaaattctacaaaggggtcgaacacacgggctctagaggtggcttgccgggggctgaag 2040
 Q K F Y K G F E H T A L E V A C R G L K
 cagagaccggacctcgaggaggtttcagagcgtacattccgtatagcttgagcactcac 2100
 Q R P D L E E V F R A Y I P Y S L S T H
 aaaggagatgatcaccagttcaaaggagcaatgtctcgttaccaagactatgctgctata 2160
 K G D D H Q F K G A M S R Y Q D Y A A I
 tcagctgct 2169
 S A A

>S-75(Stem) EU186379

GGCCAAATGGGCCATCAGGGOCACITAAACTTAAGAAAAAAAACAAAACCAGCTTCTCTTTGTATCAGACAGGCAAGTCTATGA
 TCATGGCTTCTCTGCTGCTGCTGCATOGATCTOCTTGTAAAGGAATCTCTCTOGOCATCATCAAAOCCCTCTTTGGGGITACTC
 TAGCTOCTTCCATAOCTAAGGATCTCATOCAAOGGTCCAGCTTTATOOGCAOGATCAAGATCCAAOCCOCTOCTOACTOCCAGGT

TTCTTCAGAAACCATGTGCAACAGCAGCAGOGAGAACTCCAGACCAACTAAGATCCAAGAAGCTCAACGTGTACGAGTTCAACGAAG
 GCGAOCGACACAGOCOCGAGITCTAAAACCTGGCAAGAACCACACAGCTCTGCATCGGOGAOCCTOGTCCCTTTCACTAACAA
 ACTCTACACOCGAGACCTCAAGAAACOGGTGGGATCAOCGOGGGACTCTGOGITTTGATCCAGCACGTTCTGAGAAGAAAGGC
 GAAOGCTTGAAGCTTCATACAGCTTCTACTTGGGCAATAOCGGTCACATTTCCGTTACGGGACCTTACCTGACTTACGAGGACA
 CGCTTCTOGCCATCACOCGGTGGCTOOGGOGTCTTGAAGGAGCTTACGGACAGGTCAAGCTTGTGATCOGACCAA
 GCTGTTCTACACTTTTTACTTGAAGGTGTTGTCTCTGATTTGCTGTGGAGCTCACOCGAAAACATGTTGAGCOGTGAAGGAT
 GTGAAGOCGGOGGGAGCTCAGCTGCTCAGOCOGGGGOCCTATCATAAACTTTACOGAATAATAATCATTGTGTGTTGCGCT
 TTCTCTTCTTTCTCTGATCTTTAATGGGTCTGTTAATGGGOCCTAAATAATGGCTTTTAAATATGAGCCGCTTTTCGTAAATCT
 ATGGGTGCCGAGTCCCTGGTGACTCGTTTTTTCATCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGAGGCCATAAGGCC

atgatcatggcttcctctgctgctgctgcatcgatctcccttgaaggaatctctctcgc 60
 M I M A S S A A A A S I S L V R N L S R
 catcatcaaaccctcttttgggttactctagctcctccataacctaaggatctcatcc 120
 H H Q T P L L G Y S S S F H N L R I S S
 aacgggtccagctttatccgcacgatcaagatccaccacctcctccactccagggtttctc 180
 N G P A L S A R S R S T T S S T P G F F
 agaaccatgtgcaacagcagcagcagagaactccagaccaactaagatccaagaactcaac 240
 R T M C N S S S E N S R P T K I Q E L N
 gtgtacgagttcaacgaaggcgaccgacacagccccgcagttctaaaactcggcaagaac 300
 V Y E F N E G D R H S P A V L K L G K N
 ccacaacagctctgcatcggcgacctcgtccctttcactaacaactctacaccggagac 360
 P Q Q L C I G D L V P F T N K L Y T G D
 ctcaagaaacgcgctcgggatcaccgcgggactctgctgtttgatccagcagcttctgag 420
 L K K R V G I T A G L C V L I Q H V P E
 aagaaaggcgaacgcttccaagcttcatacagcttctacttcggcgaatacggtcacatt 480
 K K G E R F E A S Y S F Y F G E Y G H I
 tccgttcagggaccttacctgacttacgaggacacgcttctcgccatcaccgggtggctcc 540
 S V Q G P Y L T Y E D T L L A I T G G S
 ggcgtcttgaaggagcttacggacaggtcaagcttcgtcagcttgtgtatccgaccaag 600
 G V F E G A Y G Q V K L R Q L V Y P T K
 ctgttctacactttttacttgaagggtgtgtctctgatttgctgtggagctcaccgga 660
 L F Y T F Y L K G V V S D L P V E L T G
 aaacatgttgagccgctcgaaggatgtgaagccggcggcggagctcagctgctcagcccg 720
 K H V E P S K D V K P A A E L S C S A R
 ggccactatcataaactttaccgaataataatcattgtgtcgttgcgctttctctctct 780
 G H Y H K L Y R I I I I V S L R F L F S
 ttctctgatctt 792
 F S D L

Figure 2–17. Nucleotide sequences and its deduced amino acid sequences of Stress in *B. rapa*.

3. FOX-Agrobacterium library를 이용한 애기장대의 변이체 선발 및 유전자 기능 해석

가. 서론

고등식물의 유전자조절은 발생단계에 따라 약 60,000여종 이상의 유전자발현에 의해서 정교하게 조절된다. 이는 빛, 물, 온도, 중력 등의 환경적인 요인에 의해서 많은 영향을 받는다 (Goldberg, 1988).

식물분자유전학은 식물세포가 가지고 있는 전형성능(totipotency)을 이용한 조직배양기술의 발달과(Shah *et al.*, 1986) 재조합 DNA 기법을 이용한 분자생물학의 발전에 힘입어, 최근 10 년간 급속한 발전을 이루어 왔다. 특히 Agrobacterium의 Ti plasmid를 운반체로한 형질전환법의 개발과(Bevan, 1984), 모델식물로 *Arabidopsis*를 이용하게 되면서 식물발생에 관한 유전학적 연구가 가속화 되었다(Meyerowitz and Pruitt, 1985). 또한 외래유전자를 식물체에 형질전환 시켜 얻은 식물체를 이용하여, 작물의 품종개량에 직접적으로 이용하고 있다(Cocking and Davey, 1987). 일례로 Vaeck 등(1987)은 박테리아 *Bacillus thuringiensis*의 곤충저항 bt 유전자를 T-DNA를 이용하여 담배를 형질전환 시켰다. 그 결과 박각시나방으로부터 저항성이 있는 식물체를 생산할 수 있었다. 현재는 벼, 토마토, 밀, 옥수수 등의 작물에 외래유전자를 삽입시켜 생산성을 향상시킨다든가, 바이러스, 박테리아, 환경재해 등에 저항성이 있는 식물체들이 계속하여 개발되고 있다(Goodman, 1987).

식물은 제놈 안에 높은 비율의 반복염기서열을 가지고 있다. 이는 종에 따라 35-72%의 다양성을 나타낸다(Okamuro and Goldberg, 1989). 이 반복염기서열이 배제된 cDNA를 분석하는 것이 식물유전자구조 연구에 효율적이다(Kuhlemeier *et al.*, 1987).

최근에 시도되고 있는 cDNA 염기분석을 이용한 cDNA 카탈로그 작성은 유전자원의 대량 확보와 더불어, 새로운 유전자의 동정, 염색체 지도 작성, 제놈 유전자 분석에 유용하게 이용되고 있다(Adams *et al.*, 1991; Adams *et al.*, 1992). Complementary DNA 카탈로그는 expressed sequencetags(ESTs)를 이용한다. 이 EST는 poly A+ RNA로부터 얻어진 150bp 이상의 DNA염기서열 단편이다. 이러한 ESTs는 발현된 유전자의 exon부위만을 포함하기 때문에 발생단계별 혹은 조직특이적인 유전자의 선별에 효과적으로 이용된다. Expressed sequence tags를 이용하여 표지된 제놈유전자 부위를 sequence tagged sites (STSs)라 한다(Olson *et al.*, 1989). 이는 제놈유전자 지도 작성을 효과적이고 경제적으로 수행하는 것을 가능하게 하였다(Stephens *et al.*, 1990).

식물의 경우 *A. thaliana*와 *O. sativa* 등의 ESTs가 보고되고 있다(Uchimiya *et al.*, 1992). 이들은 ESTs를 대사과정 혹은 환경관련 유전자를 중심으로 11개의 범주로 나누었다. GenBank 데이터베이스 검색결과 8%에 해당하는 68개의 ESTs가 기존의 알려진 유전자들과 높은 상동성을 보였다.

애기장대(*Arabidopsis thaliana*)는 십자화과 장대나물 속의 초본식물(Konczet *al.*, 1992)로서 전형적인 개화식물이면서 그 크기가 작아 좁은 공간의 실험실내에서나 멸균된 배양배지에서도 배양이 가능하다. 또한, 이 종은 고등식물 중에서 게놈(genome)의 크기가 70,000 kb로 매우 작을 뿐만 아니라(Leutwiler *et al.*, 1984) 반복적인 DNA가 거의 없는 까닭으로 유전자 지도(genome map) 작성이 용이하며(Pruitt and Meyerowitz, 1986) 돌연변이의 유발과 선택도 용이하다(Meyerowitz, 1989). 애기장대는 이러한 이유 때문에 식물분화기작을 규명하는 model system으로 이용되고 있으며(Pattom and Meike, 1988), 또한 life cycle 및 genome organization 등에 있어서도 많은 장점을 가지고 있어 분자유전학적 방법을 조직배

양 또는 원형질체 배양에 적용한 연구가 진행되고 있다(Pattom and Meike, 1988; Chaudhury and Signer, 1989).

현재, 애기장대 내의 핵에서뿐만 아니라 미토콘드리아, 엽록체에서도 많은 수의 유전자들이 그 기능과 위치가 밝혀지고 있으며, 나아가서는 염기서열이 속속 밝혀지고 있고 그에 따라 cDNA까지 마련되고 있는 상황이다. 또한 Ti-plasmid를 이용한 binary vector의 이용은 벌써 거의 모든 유전자들을 이를 통하여 식물체 내로의 자유로운 형질전환의 기틀을 마련한 바도 있다. 이렇게 축적된 정보를 통하여 특정한 유전자의 기능을 다른 식물체의 그것으로 교환해보거나 활성이 뛰어난 동일 기능의 유전자를 타 식물체로부터 형질전환 시키는 실험이 진행되고 있다.

기능 손실 돌연변이체를 통해서 유전자를 클로닝하고 그 기능을 연구하는 방법은 그 광범위한 활용성에도 불구하고 단점이 존재하여 그 유용성이 제한된다. 그리고 기능 손실 돌연변이체를 제조하는 것은 일반적으로 비교적 쉬운 반면, 해당 유전자를 클로닝 하는 것은 매우 시간이 많이 소요되었다. 그러나 바이러스의 35S 프로모터 enhancer를 이용한 활성 표지 선별법(activation tagging screen)은 기능 획득 돌연변이체를 선별함으로써 전술한 제한점을 극복할 수 있게 되었다. 특히 이 활성 표지 선별법은 얻어진 기능 획득 돌연변이체로부터 유전자를 분리하는데 걸리는 시간이 상대적으로 매우 짧다. 최근 형질 전환 기술의 발달로 대규모의 활성 표지 형질전환체 집단을 만드는 것이 점점 용이해지고 있기 때문에, 본 연구에서는 Osome 유래 FOX-Agrobacterium library를 이용한 애기장대의 변이체 선별 유전자 기능 해석을 하였다.

나. 재료 및 방법

1) 애기장대에 FOX Agrobacteria library의 형질전환 및 후대증자(T1) 획득

유전자가 도입된 Agrobacterium을 5ml YEP medium(hygromycine 30 mg/L, Rifampicin 30 mg/L)에 접종하고, 30°C shaking incubator (250 rpm)에서 overnight culture한다. 이렇게 배양된 seed culture를 500ml YEP medium(only containing hygromycine)에 OD값(600 nm) 0.1이 되게 접종한다. 이 접종된 본 배양 flask를 28°C shaking incubator(250 rpm)에서 OD값(600 nm) 0.8이 될 때까지 배양한다. 이렇게 배양된 Agrobacterium 배양액 500ml에 Siluent 77 (detergent) 200 µl 를 첨가하고 잘 섞어준다. 이 Siluent 77은 강력한 detergent로서 식물과 Agrobacterium과의 반발력을 줄여줌으로서 더 많은 수의 Agrobacterium이 식물체와 직접 접촉할 수 있게 한다.

이렇게 준비된 Agrobacterium 배양 용액에 흙에서 3주정도 자란 건강한 wild-type *Arabidopsis thaliana*의 꽃 부분을 4-5회 적셔준다. 그 후 식물체를 기울여 커버를 쉬운 채 25°C에서 2일 동안 식물체를 외부와 차단시킨다. 2일 뒤 커버를 벗기고, 적당량의 물을 주어 약 3-4주 동안 식물체의 씨를 얻기 위해 키운다. 이렇게 얻어진 씨를 선별배지인 MS agar plate(hygromycine 50 mg/L) 상에서 항생체에 저항성을 가지는 plant seedling을 선별한다 (Fig. 2-17).

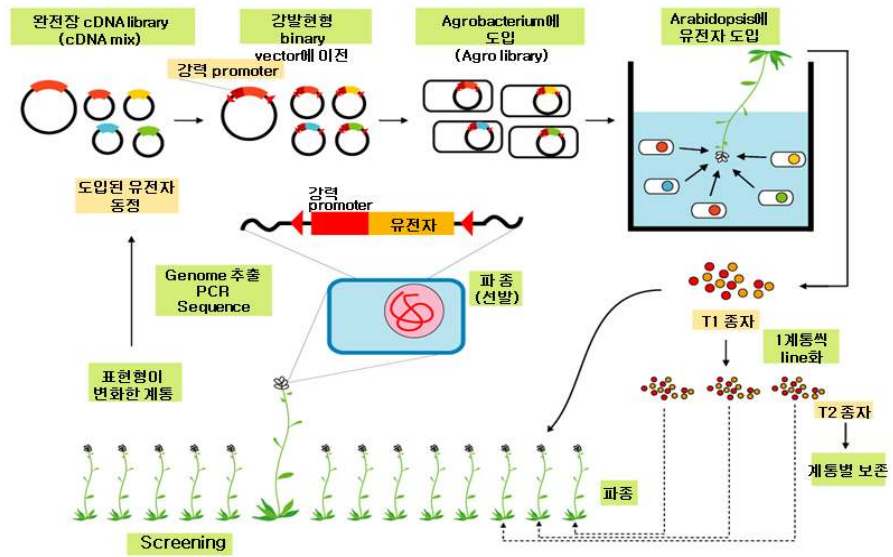


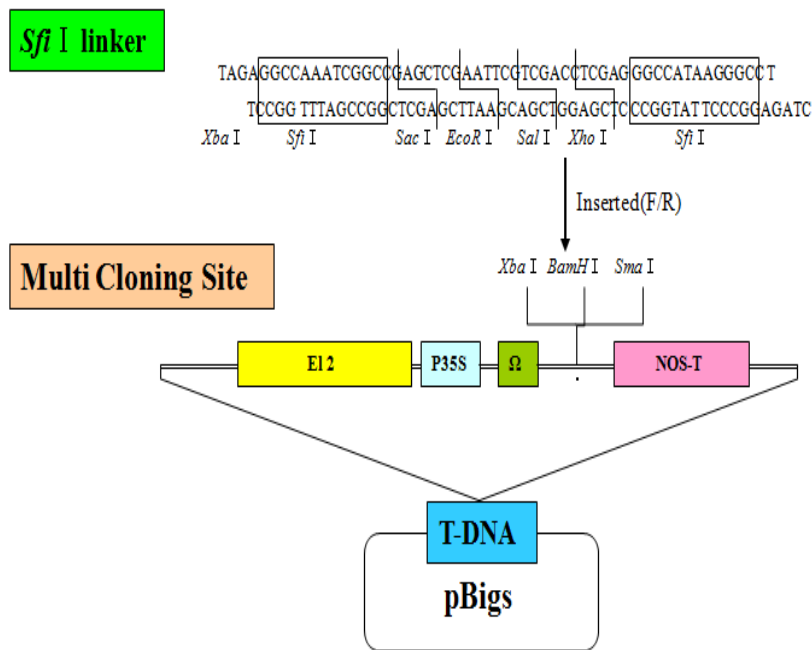
Figure 2-17. Plan of FOX-Agrobacterium library transformed into *arabidopsis*.

Table 2-15. FOX T1 institute phenotype investigation item

| Comment No | Tissue | phenotype | Comment No | Tissue | phenotype |
|------------|----------------|---------------|------------|--------------|------------------------|
| A-1 | Rosette | pale green | C-1 | Stem | fasiation |
| A-2 | | dark green | C-2 | | thick |
| A-3 | | Anthocyanin | C-3 | | thin |
| A-4 | | large leaves | C-4 | | pale green |
| A-5 | | small leaves | C-5 | | dark green |
| A-6 | | long petiole | D-1 | Branching | bushy |
| A-7 | | short petiole | D-2 | | hyper apical dominance |
| A-8 | | Epinastic | D-3 | | type of inflorescence |
| A-9 | | Hyponastic | D-4 | | short internode |
| A-10 | | Tricomes | D-5 | | long internode |
| A-11 | | Shape | D-6 | | zig-zig |
| A-12 | | round leaves | D-7 | | Others |
| A-13 | | narrow leaves | E-1 | Plant height | dwarf |
| A-14 | | few leaves | E-2 | | semi dwaf |
| A-15 | | no rosette | E-3 | | tall |
| A-16 | | Patch | E-4 | | very tall |
| A-17 | | Others | F-1 | Flower | stigme |
| B-1 | Cauline leaves | Small | F-2 | | ovary |
| B-2 | | large | F-3 | | anther |
| B-3 | | few | F-4 | | filament |
| B-4 | | Many | F-5 | | petal |
| B-5 | | Narrow | F-6 | | sepal |
| B-6 | | round | F-7 | | pedicel |
| B-7 | | Epinastic | F-8 | | others |
| B-8 | | Hyponastic | G-1 | | Seed yeild |
| B-9 | | Others | G-2 | low | |
| | | G-3 | sterile | | |

2) 형질 변이체 선발 및 T2 종자 획득

형질전환 된 T1 종자를 70% EtOH에서 2분, 1% 차아염소산나트륨 +1% SDS에서 15분 간 각반하였다. Cleanbench 내에서 멸균수로 3-5회 수세한 후, BAM 배지(KNO₃ 0.1011g/ml, 1ml/1 L, Bacto Agar 7g/1 L, Hygromycin B 50mg/L, Cefotaxime Sodium 100mg/L)에 파종하여 선발하였다. 파종법은 멸균한 종자를 0.1% 한천배지(무균)에 현탁하여 배지표면에 펼치고 약 0.25g의 종자를 10x10cm plate에 파종하였다. 파종 후, 30-60분간 clean bench내에서 plate를 기울여서 흐르지 않을 정도까지 건조시켰다. 건조 후, 서지컬 테이프로 봉하고 알루미늄 호일로 싸서 4℃에 3-4일간 저온처리 후, 알루미늄 호일을 벗기고 22-24℃에서 발아시켰다. 1-2주 경과 후, 약제내성 개체를 pot에 옮겼다. 형질변이체는 Table 2-15의 항목에 따라 변이 유무를 조사하였고 자식종자(T2)를 수확하여 계통별로 보존하였다.



GGGNNNNNT TGA TTA TTAGGA AGTTCA TTT ATT CCG AGAGG GTA CG TAT TTT TAC AAC AAT TAC CAA CAA CAACAA CAAAC
 Primer1 → Ω

AACAACAACATT ACA TTT TAC ATT CTA CAA CTA CAT CTA GAG GCCAAA TCG GCC GAG CTC GAA TTC GTC GAC CTC GAG GG
*Sfi*I

CCA TAA GGG CCT CTA GAG GAT CCC CGG GGC GGC CGC GAG CTC GAA TTT CCC CGA TCG TTC AAA CAT TTG GCA ATA AAG TT
*Sfi*I ← Primer2

TCTTAA GATTGA ATC CTG TTG CCG GTC TTG CGA TGA TTA TCA

Primer1 ; **ATTACATTTTACATTCTACAACACTACATCT**, Primer2 ; **CAAATGTTTGAACGATCGGGAAAT**
 E1 is a part of the 35S promoter to enhance transcription and omega sequence is in the transcription product to stabilize the mRNA produced.

Figure 2-18. Binary pBigs vector map with *Sfi* I site structure of the expression of cDNA library.

3) 변이체로부터 분리된 기능유전자 GenBank 등록

가) Total DNA의 추출

변이체로부터 total DNA의 추출은 CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide) 법을 이용하였다. 형질전환체 및 대조 식물로부터 채취한 0.5g의 잎은 액체질소를 이용하여 미세하게 분쇄하였고, DNA extraction buffer [100mM Tris-HCl (pH 8.0), 50mM EDTA, 500mM NaCl] 400 μ l가 담긴 1.5ml 원심분리용 튜브에 갈아진 조직을 넣고 상하로 20회 혼합하였다. 그 후, 2 \times CTAB buffer [2% (w/v) CTAB, 100mM Tris-HCl (pH8.0), 20mM EDTA, 1.4M NaCl, 1% pvp-40 (polyvinylpyrrolidone)] 200 μ l를 첨가하여 같은 방법으로 혼합하고 10% SDS를 넣고 10회 정도 상하로 섞어 준 후, 65 $^{\circ}$ C 항온수조에 20분간 방치하였다. 5M potassium acetate (pH 7.5) 200 μ l를 첨가하고 50회 정도로 상하로 섞어준 후, PCI [Phenol/Chloroform/Isoamylalchol (25: 24: 1)]를 700 μ l 넣고 30회 정도 상하로 섞어 실온에서 12,000rpm, 10분간 원심 하여 단백질을 분리해냈다. 상층 400 μ l정도를 새 1.5ml tube로 옮긴 후 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20 $^{\circ}$ C 냉동고에 20분간 보관하였다가 4 $^{\circ}$ C의 12,000rpm에서 15분간 원심분리 하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 70% ethanol 1ml를 넣고 세척한 다음 실온에서 완전히 건조시키고 RNase (1mg/ml) 2 μ l가 첨가된 TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH7.4) 50 μ l에 충분히 녹인 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 방치하여 사용하였다.

나) 도입유전자 검정을 위한 PCR분석

형질변이체를 확인하기 위한 PCR반응은 20ng의 주형 DNA를 사용하였고, pBig5 binary vector의 Primer1; ATTACATTTTACATTCTACAACACTACATC T, Primer2; CAAATGTTTGAACGATCGGGGAAAT를 이용하여 96 $^{\circ}$ C에서 5분간 pre-denaturation 시킨 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 2분간 extension과정을 35cycles 하였으며, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 extension을 실시하였다. 얻어진 증폭 산물은 1.5% agarose gel상에 영동한 후 ethidium bromide로 10분간 염색하여 band를 확인하였다(Fig. 2-18).

다) Gel에서 PCR 산물의 회수 및 pCR[®]2.1-TOPO vector에 cloning

Gel에서 단일 band를 추출하여 1.5ml tube에 넣고 gel의 무게에 적합한 Membrane binding solution을 첨가하였다(Gel clean system, Promega Kit). Gel melting을 하기 위하여 55 $^{\circ}$ C에서 10분간 놓아두었다가 SV mini-column/1.5ml tube에 DNA를 옮긴 후 실온 또는 4 $^{\circ}$ C에 1분간 방치하였다. Column을 통과한 용액을 버리고, 700 μ l의 wash solution을 넣고 11,000 rpm에서 1분(실온 또는 4 $^{\circ}$ C)간 원심하여 500 μ l의 wash solution을 다시 넣고 11,000 rpm, 5분 (실온 또는 4 $^{\circ}$ C)간 원심분리 하였다. SV mini-column을 새로운 1.5ml tube에 옮기고 50 μ l의 DDW를 넣고 실온에 1분간 방치하였다. 다시금 11,000 rpm에서 1분간 (실온 또는 4 $^{\circ}$ C) 원심한 후 2 μ l, 5 μ l를 영동하여 DNA 양을 check하였으며, Gel에서 추출한 PCR 산물 50~100ng과 Salt Solution 1 μ l, TOPO Vector(Invitrogen, San Diego, CA, USA)에 1 μ l, DDW X μ l를 넣고 총 6 μ l의 mix를 만들어 실온에 15분간 두었다가 얼음 또는 -20 $^{\circ}$ C에 방치하였다. TOPO Reaction 2 μ l를 One shot cell에 첨가하고 얼음에 5분간 놓아둔 후 42 $^{\circ}$ C에 30초간 처리하였다. 250 μ l의 SOC 배지를 첨가한 후에 5000 rpm으로 5분간 원심 한 다음 항생제 ampicillin이 들어간 LB 배지에 X-gal과 IPTG를 30분전에 spread해 두었다가 대장균을 도말하여 37 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 배양하였다.

라) plasmid DNA 추출 및 염기서열 분석

plasmid DNA를 추출하여 DNA 염기서열을 결정하였다. 염기서열의 상동성은 BLAST를 이용하였으며, 확인된 신규유전자는 GenBank 등록하였다.

마) RT-PCR에 의한 도입 유전자 발현 분석

유전자 도입이 확인된 형질전환체의 유전자의 발현정도를 분석하기 위해 잎 조직 (0.2g)에서 mRNA를 분리하여 RT-PCR 분석을 하였다. 분리한 mRNA는 reverse transcriptase (Promega, USA)를 사용하여 cDNA로 전환하고 spectrophotometer에 의해 일률적으로 조정된 cDNA를 주형으로 사용하였다. RT-PCR에 사용한 유전자의 primer set은 염기서열의 200-250 bp 영역에서 합성하여 사용하였다. PCR 조건은 48°C에서 45분간 reverse transcription 시킨 후, 94°C에서 2분간 pre-denaturation 시킨 후, 94°C에서 30초간 denaturation, 53°C에서 1분간 annealing, 68°C에서 2분간 extension과정을 40cycles로 하였으며, 마지막으로 68°C에서 7분간 extension을 실시하였다. RT-PCR의 정량적 기준으로는 actin 유전자를 이용하였다. β - actin 유전자의 primer set는 forward 5'-ATGGTTGGGATGGGTCAAAAA-3', reverse 5'-TCTTTAATGTCACGGACGATT-3'로 합성하여 이용하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel상에 영동한 후 ethidium bromide로 10분간 염색하여 각각의 band를 확인하였다.

다. 결과 및 고찰

1) 애기장대에 FOX Agrobacteria library의 형질전환 및 후대종자(T1) 획득

FOX Agrobacteria library를 애기장대에 형질전환하여 300계통의 T1종자를 획득하였다. 획득한 종자 무게와 예상 립수를 Table 2-16에 나타냈다.

Table 2-16. Seed weight and unit of T1

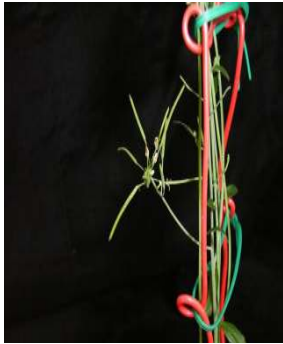
| Mutant NO. | seed weight (g) | Seed unit (unit) | Mutant NO. | seed weight (g) | Seed unit (unit) | Mutant NO. | seed weight (g) | Seed unit (unit) |
|------------|-----------------|------------------|------------|-----------------|------------------|------------|-----------------|------------------|
| 1 | 0.273 | 10238 | 101 | 0.1 | 3750 | 201 | 0.154 | 5775 |
| 2 | 0.116 | 4350 | 102 | 0.076 | 2850 | 202 | 0.125 | 4688 |
| 3 | 0.141 | 5288 | 103 | 0.162 | 6075 | 203 | 0.173 | 6488 |
| 4 | 0.077 | 2888 | 104 | 0.106 | 3975 | 204 | 0.094 | 3525 |
| 5 | 0.265 | 9938 | 105 | 0.129 | 4838 | 205 | 0.088 | 3300 |
| 6 | 0.15 | 5625 | 106 | 0.147 | 5513 | 206 | 0.085 | 3188 |
| 7 | 0.083 | 3113 | 107 | 0.168 | 6300 | 207 | 0.126 | 4725 |
| 8 | 0.095 | 3563 | 108 | 0.113 | 4238 | 208 | 0.118 | 4425 |
| 9 | 0.31 | 11625 | 109 | 0.109 | 4088 | 209 | 0.126 | 4725 |
| 10 | 0.172 | 6450 | 110 | 0.133 | 4988 | 210 | 0.228 | 8550 |
| 11 | 0.088 | 3300 | 111 | 0.239 | 8963 | 211 | 0.085 | 3188 |
| 12 | 0.127 | 4763 | 112 | 0.254 | 9525 | 212 | 0.106 | 3975 |
| 13 | 0.064 | 2400 | 113 | 0.11 | 4125 | 213 | 0.078 | 2925 |

| | | | | | | | | |
|----|-------|------|-----|-------|-------|-----|-------|------|
| 14 | 0.155 | 5813 | 114 | 0.113 | 4238 | 214 | 0.106 | 3975 |
| 15 | 0.085 | 3188 | 115 | 0.108 | 4050 | 215 | 0.168 | 6300 |
| 16 | 0.17 | 6375 | 116 | 0.151 | 5663 | 216 | 0.17 | 6375 |
| 17 | 0.111 | 4163 | 117 | 0.234 | 8775 | 217 | 0.11 | 4125 |
| 18 | 0.107 | 4013 | 118 | 0.098 | 3675 | 218 | 0.169 | 6338 |
| 19 | 0.192 | 7200 | 119 | 0.226 | 8475 | 219 | 0.021 | 788 |
| 20 | 0.059 | 2213 | 120 | 0.11 | 4125 | 220 | 0.131 | 4913 |
| 21 | 0.141 | 5288 | 121 | 0.125 | 4688 | 221 | 0.062 | 2325 |
| 22 | 0.23 | 8625 | 122 | 0.199 | 7463 | 222 | 0.068 | 2550 |
| 23 | 0.071 | 2663 | 123 | 0.176 | 6600 | 223 | 0.118 | 4425 |
| 24 | 0.115 | 4313 | 124 | 0.184 | 6900 | 224 | 0.145 | 5438 |
| 25 | 0.025 | 938 | 125 | 0.089 | 3338 | 225 | 0.07 | 2625 |
| 26 | 0.106 | 3975 | 126 | 0.086 | 3225 | 226 | 0.14 | 5250 |
| 27 | 0.101 | 3788 | 127 | 0.073 | 2738 | 227 | 0.058 | 2175 |
| 28 | 0.052 | 1950 | 128 | 0.211 | 7913 | 228 | 0.111 | 4163 |
| 29 | 0.145 | 5438 | 129 | 0.097 | 3638 | 229 | 0.146 | 5475 |
| 30 | 0.07 | 2625 | 130 | 0.094 | 3525 | 230 | 0.111 | 4163 |
| 31 | 0.148 | 5550 | 131 | 0.09 | 3375 | 231 | 0.001 | 38 |
| 32 | 0.092 | 3450 | 132 | 0.109 | 4088 | 232 | 0.087 | 3263 |
| 33 | 0.095 | 3563 | 133 | 0.266 | 9975 | 233 | 0.118 | 4425 |
| 34 | 0.008 | 300 | 134 | 0.115 | 4313 | 234 | 0.103 | 3863 |
| 35 | 0.236 | 8850 | 135 | 0.057 | 2138 | 235 | 0.192 | 7200 |
| 36 | 0.108 | 4050 | 136 | 0.169 | 6338 | 236 | 0.156 | 5850 |
| 37 | 0.078 | 2925 | 137 | 0.081 | 3038 | 237 | 0.135 | 5063 |
| 38 | 0.231 | 8663 | 138 | 0.196 | 7350 | 238 | 0.088 | 3300 |
| 39 | 0.1 | 3750 | 139 | 0.206 | 7725 | 239 | 0.079 | 2963 |
| 40 | 0.127 | 4763 | 140 | 0.031 | 1163 | 240 | 0.108 | 4050 |
| 41 | 0.09 | 3375 | 141 | 0.234 | 8775 | 241 | 0.082 | 3075 |
| 42 | 0.212 | 7950 | 142 | 0.302 | 11325 | 242 | 0.082 | 3075 |
| 43 | 0.198 | 7425 | 143 | 0.07 | 2625 | 243 | 0.141 | 5288 |
| 44 | 0.097 | 3638 | 144 | 0.056 | 2100 | 244 | 0.085 | 3188 |
| 45 | 0.073 | 2738 | 145 | 0.201 | 7538 | 245 | 0.086 | 3225 |
| 46 | 0.133 | 4988 | 146 | 0.13 | 4875 | 246 | 0.139 | 5213 |
| 47 | 0.166 | 6225 | 147 | 0.178 | 6675 | 247 | 0.115 | 4313 |
| 48 | 0.17 | 6375 | 148 | 0.195 | 7313 | 248 | 0.097 | 3638 |

| | | | | | | | | |
|----|-------|------|-----|-------|-------|-----|-------|------|
| 49 | 0.032 | 1200 | 149 | 0.274 | 10275 | 249 | 0.062 | 2325 |
| 50 | 0.169 | 6338 | 150 | 0.128 | 4800 | 250 | 0.117 | 4388 |
| 51 | 0.158 | 5925 | 151 | 0.139 | 5213 | 251 | 0.112 | 4200 |
| 52 | 0.111 | 4163 | 152 | 0.139 | 5213 | 252 | 0.116 | 4350 |
| 53 | 0.096 | 3600 | 153 | 0.114 | 4275 | 253 | 0.162 | 6075 |
| 54 | 0.072 | 2700 | 154 | 0.124 | 4650 | 254 | 0.096 | 3600 |
| 55 | 0.095 | 3563 | 155 | 0.123 | 4613 | 255 | 0.096 | 3600 |
| 56 | 0.114 | 4275 | 156 | - | 10립정도 | 256 | 0.063 | 2363 |
| 57 | 0.115 | 4313 | 157 | 0.104 | 3900 | 257 | 0.164 | 6150 |
| 58 | 0.098 | 3675 | 158 | 0.106 | 3975 | 258 | 0.146 | 5475 |
| 59 | 0.11 | 4125 | 159 | 0.119 | 4463 | 259 | 0.205 | 7688 |
| 60 | 0.081 | 3038 | 160 | 0.122 | 4575 | 260 | 0.111 | 4163 |
| 61 | 0.129 | 4838 | 161 | 0.14 | 5250 | 261 | 0.12 | 4500 |
| 62 | 0.049 | 1838 | 162 | 0.072 | 2700 | 262 | 0.124 | 4650 |
| 63 | 0.009 | 338 | 163 | 0.077 | 2888 | 263 | 0.09 | 3375 |
| 64 | 0.039 | 1463 | 164 | 0.088 | 3300 | 264 | 0.211 | 7913 |
| 65 | 0.104 | 3900 | 165 | 0.11 | 4125 | 265 | 0.24 | 9000 |
| 66 | 0.064 | 2400 | 166 | 0.083 | 3113 | 266 | 0.08 | 3000 |
| 67 | 0.042 | 1575 | 167 | 0.162 | 6075 | 267 | 0.049 | 1838 |
| 68 | 0.148 | 5550 | 168 | 0.067 | 2513 | 268 | 0.188 | 7050 |
| 69 | 0.081 | 3038 | 169 | 0.111 | 4163 | 269 | 0.168 | 6300 |
| 70 | 0.062 | 2325 | 170 | 0.112 | 4200 | 270 | 0.106 | 3975 |
| 71 | 0.002 | 75 | 171 | 0.052 | 1950 | 271 | 0.178 | 6675 |
| 72 | 0.008 | 300 | 172 | 0.012 | 450 | 272 | 0.12 | 4500 |
| 73 | 0.12 | 4500 | 173 | 0.13 | 4875 | 273 | 0.095 | 3563 |
| 74 | 0.083 | 3113 | 174 | 0.078 | 2925 | 274 | 0.155 | 5813 |
| 75 | 0.152 | 5700 | 175 | 0.148 | 5550 | 275 | 0.176 | 6600 |
| 76 | 0.051 | 1913 | 176 | 0.069 | 2588 | 276 | 0.082 | 3075 |
| 77 | 0.012 | 450 | 177 | 0.04 | 1500 | 277 | 0.044 | 1650 |
| 78 | 0.018 | 675 | 178 | 0.1 | 3750 | 278 | 0.122 | 4575 |
| 79 | 0.12 | 4500 | 179 | 0.126 | 4725 | 279 | 0.161 | 6038 |
| 80 | 0.08 | 3000 | 180 | 0.071 | 2663 | 280 | 0.187 | 7013 |
| 81 | 0.103 | 3863 | 181 | 0.11 | 4125 | 281 | 0.242 | 9075 |
| 82 | 0.067 | 2513 | 182 | 0.026 | 975 | 282 | 0.202 | 7575 |
| 83 | 0.2 | 7500 | 183 | 0.109 | 4088 | 283 | 0.252 | 9450 |

| | | | | | | | | |
|-----|-------|------|-----|-------|------|-----|-----------|-------|
| 84 | 0.069 | 2588 | 184 | 0.14 | 5250 | 284 | 0.142 | 5325 |
| 85 | 0.099 | 3713 | 185 | 0.111 | 4163 | 285 | 0.144 | 5400 |
| 86 | 0.084 | 3150 | 186 | 0.163 | 6113 | 286 | 0.161 | 6038 |
| 87 | 0.179 | 6713 | 187 | 0.116 | 4350 | 287 | 0.116 | 4350 |
| 88 | 0.073 | 2738 | 188 | 0.07 | 2625 | 288 | 0.159 | 5963 |
| 89 | 0.104 | 3900 | 189 | 0.239 | 8963 | 289 | 0.081 | 3038 |
| 90 | 0.22 | 8250 | 190 | 0.074 | 2775 | 290 | 0.137 | 5138 |
| 91 | 0.081 | 3038 | 191 | 0.181 | 6788 | 291 | 0.17 | 6375 |
| 92 | 0.108 | 4050 | 192 | 0.06 | 2250 | 292 | 고사 | |
| 93 | 0.083 | 3113 | 193 | 0.031 | 1163 | 293 | 종자無, DNA有 | |
| 94 | 0.099 | 3713 | 194 | 0.114 | 4275 | 294 | 0.186 | 6975 |
| 95 | 0.012 | 450 | 195 | 0.065 | 2438 | 295 | 종자無, DNA有 | |
| 96 | 0.058 | 2175 | 196 | 0.187 | 7013 | 296 | 0.152 | 5700 |
| 97 | 0.031 | 1163 | 197 | 0.171 | 6413 | 297 | - | 10립정도 |
| 98 | 0.073 | 2738 | 198 | 0.143 | 5363 | 298 | 0.184 | 6900 |
| 99 | 0.082 | 3075 | 199 | 0.191 | 7163 | 299 | 0.011 | 413 |
| 100 | 0.108 | 4050 | 200 | 0.095 | 3563 | 300 | 0.067 | 2513 |

T1종자는 1계통씩 line화하여 파종, 개화를 유도하였으며, 그 중 표현형질이 변한 27 형질변이체를 선발하였다(Fig. 2-19).



10. **Branching**—others



17. **Rosette**—anthocyanin



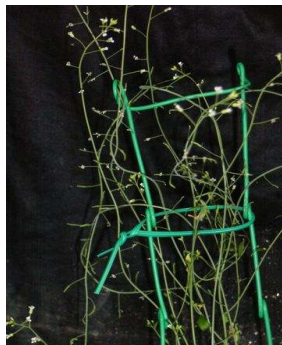
19. **Rosette**—anthocyan



23. **Rosette**—round leaves



25. **Plant height**—dwarf



34. **Seed yeild**—sterile



54. **Rosette**—anthocyanin



55. **Rosette**—anthocyanin



56. **Branching**—other



95. **Seed yeild**—sterile
115. **Rosette**—anthocyanin

112. **Rosette**—hyponastic



135. **Plant height**—dwarf



136. **Flower**—petal
164. **Seed yeild**—sterile

156. **Branching**—other



172. **Plant height**-dwarf



182. **Branching**-other
219. **Rosette**-shape



205. **Branching**-other



231. **Cauline leaves**-albino



283. **Rosette**-hyponastic
295. **Plant height**-dwarf



293. **Rosette**-anthocyanin(dwarf)





297. **Plant height**-dwarf

299. **Plant height**-dwarf

300. **Rosette**-anthocyanin

Figure 2-19. Phenotype mutants of FOX T1.

2) 변이체로부터 분리된 기능유전자 GenBank 등록

선발된 형질 변이체로부터 도입된 cDNA를 PCR법에 의해 분리하였으며(Fig. 2-20), 그 중 14 cDNA를 full-length sequencing하였다. 그 결과 7개는 등록된 유전자와 상동성이 있었으나, 7개는 unknown 유전자였다. 금후 T2종자에서 변이를 재확인 한 후, cloning된 유전자와의 관련성을 분석할 것이다.

T1 형질변이체로부터 도입된 cDNA를 분리하여 그중 14개 cDNA는 염기서열 결정 후, 신규유전자는 GenBank에 등록하였으며(Table 2-17), 4개 cDNA는 염기서열 결정중이다.

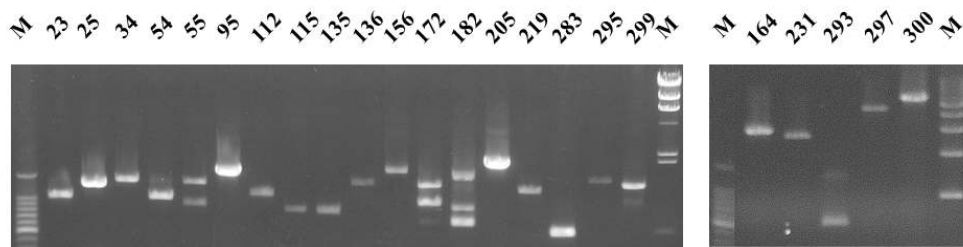


Figure 2-20. Gel electrophoresis of PCR analysis in gDNA of phenotype mutants.

3) 형질변이체 T2 세대의 변이 재확인

T2세대 300 계통에 관하여 변이를 재확인 한 결과, 3 계통에서 변이가 재확인하였으며, 나머지는 변이를 재확인 할 수 없었다(Fig. 2-21). 3 계통 형질변이체의 cDNA를 추출하여 증폭하였으며, 5'-염기서열 분석 후 Blast 검색하였다.

Table 2–17. BlastX analysis and GenBank No. of cloning extracted from phenotype mutants T1

| Mutant NO. | GenBank NO. | BlastX | Remarks |
|------------|-------------|--|-----------------|
| 23 | DQ296175 | 30S ribosomal protein S10–like [Brassica napus] (AAW22623.1) Identities = Query 151 aa/ Subject 197 aa(76%) | |
| 25 | DQ296188 | At1g07140/F10K1_27 [Arabidopsis thaliana] (AAM19880.1) Identities = Query 145 aa/ Subject 153 aa(94%) | unknown protein |
| 34 | DQ296176 | At1g74230 [Arabidopsis thaliana] (AAP13423.1) Identities = Query 16 aa/ Subject 111 aa(95%) | unknown protein |
| 54 | DQ296177 | AT5g49210/K21P3_8 [Arabidopsis thaliana] (AAM19903.1) Identities = Query 114 aa/ Subject 196 aa(58%) | unknown protein |
| 55 | DQ296190 | OST3/OST6 family protein [Arabidopsis thaliana] (NP_176372.1) Identities = Query 154 aa/ Subject 197 aa(78%) | |
| 112 | DQ296191 | arabinogalactan protein–like [Arabidopsis thaliana] (AAM62683.1) Identities = Query 128 aa/ Subject 153 aa(83%) | |
| 115 | DQ296178 | type 2 peroxiredoxin [Brassica rapa subsp. pekinensis] (AAD33602.1) Identities = Query 147 aa/ Subject 162 aa(90%) | |
| 135 | DQ296187 | ribosomal L23a–like protein [Arabidopsis thaliana] (CAB75762.1) Identities = Query 96 aa/ Subject 150 aa(64%) | |
| 136 | DQ296192 | cyclin, putative [Arabidopsis thaliana](NP_973983.1) Identities = Query 180 aa/ Subject 238 aa(75%) | |
| 172 | DQ296189 | At3g20570 [Arabidopsis thaliana](AAP88350.1) Identities = Query 103 aa/ Subject 122 aa(84%) | unknown protein |
| 182 | DQ296179 | At1g30380/T4K22_2 [Arabidopsis thaliana](AAL69522.1) Identities = Query 113 aa/ Subject 130 aa(86%) | unknown protein |
| 219 | DQ296180 | voltage–dependent anion–selective channel protein [Brassica rapa] (AAS21632.1) Identities = Query 125 aa/ Subject 156 aa(80%) | |
| 283 | DQ296181 | unknown [Arabidopsis thaliana](AAM65316.1) Identities = Query 25 aa/ Subject 27 aa(92%) | unknown protein |
| 295 | DQ296182 | unnamed protein product [Arabidopsis thaliana](BAB11183.1) Identities = Query 125 aa/ Subject 268 aa(46%) | unknown protein |

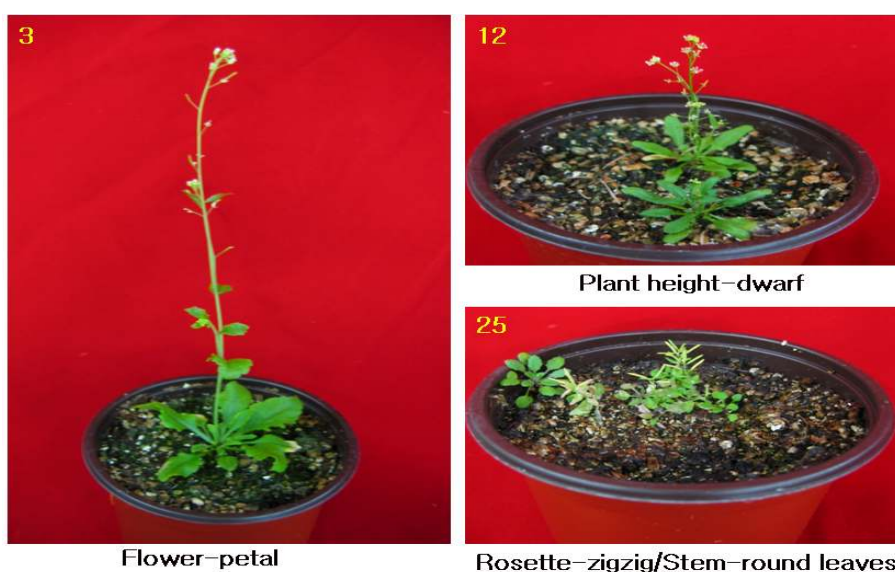


Figure 2-21. Showing of phenotype mutants 3(Rosette-zigzag and stem round leaves), 12(flower petal) and 25(Plant height-dwarf and Flower petal). All plants are in the T2 generation and have been grown for 6 weeks.

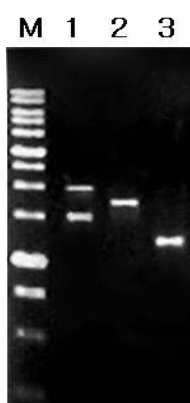


Figure 2-22. Insert DNA analysis by using flanking primer in phenotype mutants 3, 12 and 25. Lane M; Molecular marker, 1; phenotype mutant 3, 2; phenotype mutant 12 and 3; phenotype mutant 25.

Table 2-18. BlastN analysis of insert cDNA extracted from 3, 12, and 25 phenotype mutants of T2 N-terminal sequence

| Acc. No. | Description | Insert DNA size (bp) | Identity (%) |
|----------|--|----------------------|--------------|
| 3 | <i>Arabidopsis thaliana</i> LIP1; lipoic acid synthase LIP | 1,500 | 80 |
| 12 | <i>Mus musculus</i> chromosome 9, clone RP24-228p8 | 1,800 | 85 |
| 25 | <i>Arabidopsis thaliana</i> phospholipase C (AT1G49740) | 1,300 | 67 |

3) 형질전환체 T2 종자로부터 stress 저항성 개체 선발 및 도입된 cDNA 분석

중금속 및 염 스트레스 저항성 개체 선발을 위하여 wild type을 이용하여 CdSO₄(a), CoSO₄(b), CuSO₄(c), FeSO₄(d), NaCl(e), ZnSO₄(f)를 이용하여 선발된 농도는 카드뮴은 0-50μM, 코발트는 0-100μM, 구리는 0-150μM, 철은 0-700μM, 염은 0-150mM, 아연은 0-700μM이었다(Fig. 2-23). T2세대 300 계통에 종자를 선발된 중금속 및 염 배지에 파종한 결과, 카드뮴은 60μM, 코발트는 120μM, 구리는 150μM, 철은 700μM, 염은 150mM, 아연은 800μM의 농도에서 T2 종자로부터 중금속 저항성 개체 선발이었다(Fig. 2-24). 각각의 배지에서의 저항성 개체의 cDNA를 추출하여 증폭하였으며, 5'-염기서열 분석 후 Blast 검색하였다.

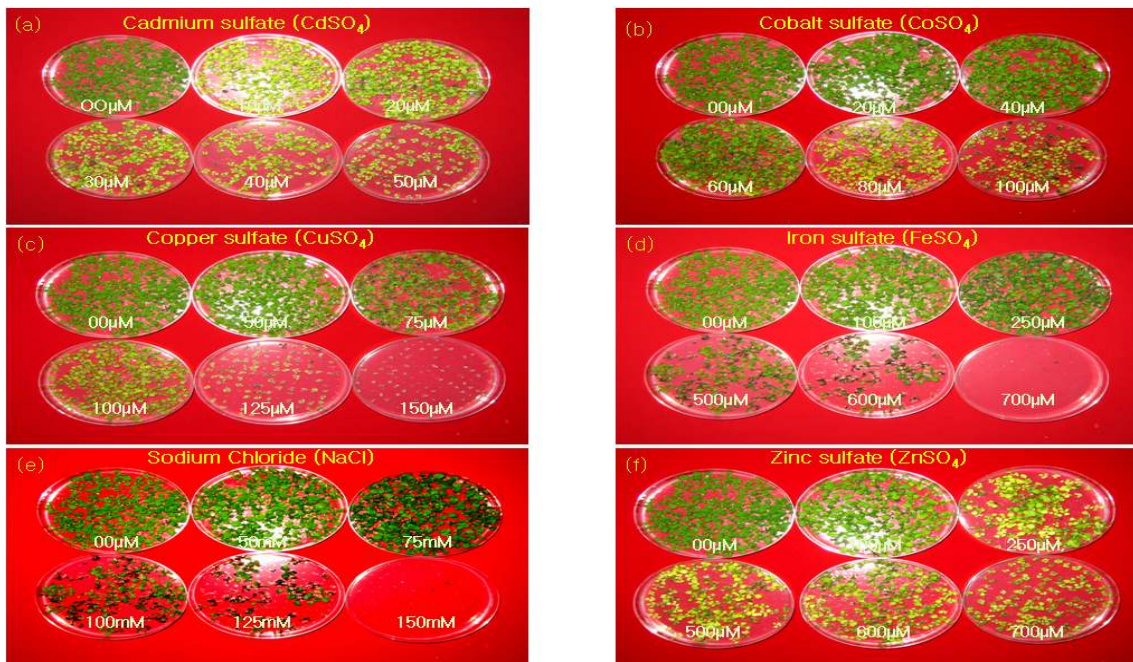


Figure 2-23. Plants were sown in vitro on MS agar medium, supplement or not with increasing a) Cadmium sulfate (0-50μM), b) Cobalt sulfate (0-100μM), c) Copper sulfate (0-150μM), Iron sulfate (0-700μM), Sodium sulfate (0-150mM) and Zinc sulfate (0-700μM) and harvested 21 days after germination.

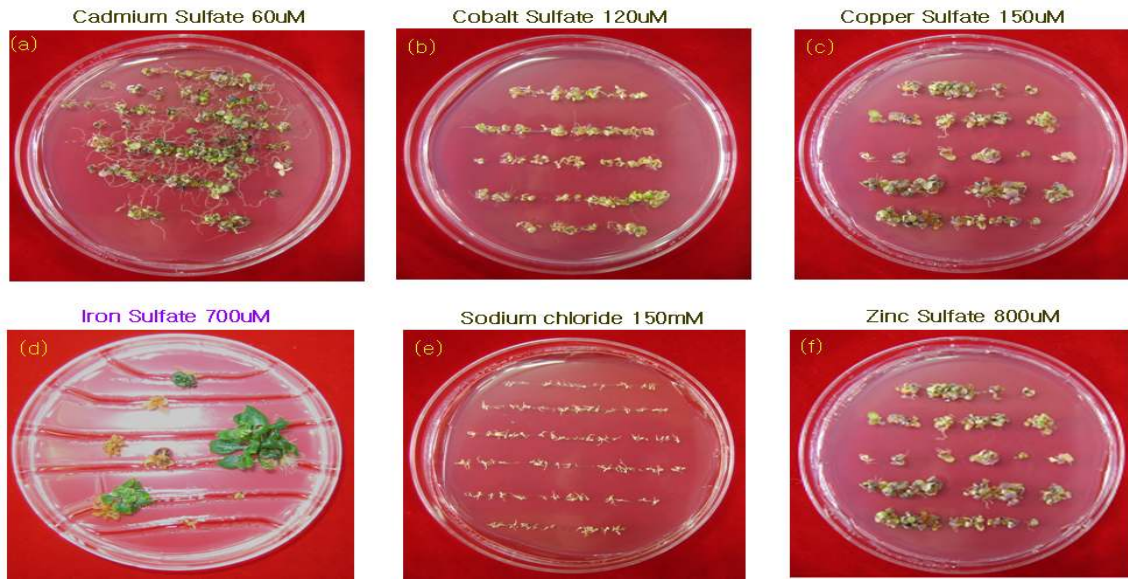


Figure 2-24. Plants were selected in vitro on MS agar hygromycin 20mg/ul medium, a) Cadmium sulfate 60µM, b) Cobalt sulfate 120µM, c) Copper sulfate 150µM, Iron sulfate 700µM, Sodium sulfate 150mM and Zinc sulfate 800µM) and harvested 21 days after germination.

4) Universal stress 저항성 유전자 MAPK(mitogen-activated protein kinase)의 아미노산 alignment

| | | | | | | | |
|-----------|-----|-------------------------|----------------|---|--|------------------------------------|--------------------------|
| MAPKK | 1 | PYFTHLEAHRPSHESFKADMEKQ | --STSSS | -----SSSSS | SWIRGSCIGRC | CFVSKAVSKIDGRVFAVKSVDLATCLPSQ | SESLE |
| BRMAKKK | 1 | -----MEKQ | --STSSS | -----SSSSS | SWIRGSCIGRC | CFVSKAVSKIDGRVFAVKSVDLATCLPSQ | SESLE |
| ABE78950 | 1 | ----- | ----- | ----- | MCGITKSSWIRGSKMVGCCSFGSVLLAMKSTGGLEFVVKAKHSEAG | ----- | RDAL |
| NP-172195 | 1 | -----MEKQ | SRNTCSSS | MLSSPSS | SWIRGACIGRC | CFVSKAVSKIDGRVFAVKSVDLATSLPTQ | SESLE |
| NP-194419 | 1 | ----- | ----- | ----- | MEIHWIRGPTIGRC | STAVSHATS--SSGELFAVKSVDLSS | -----SSLQ |
| MAPKK | 92 | HPHIVRELGDDVSR | EGTTSE | RNLHLEVLPE | GDVANG | -----GKTVNEETLLRQYVWCLVSALEHHHANG | GIVHCDVRSKNVLVANGGSSV |
| BRMAKKK | 73 | HPHIVRELGDDVSR | EGTTSE | RNLHLEVLPE | GDVANG | -----GKTVNEETLLRQYVWCLVSALEHHHANG | GIVHCDVRSKNVLVANGGSSV |
| ABE78950 | 65 | SPYIVQCLGTDYDNDN | --QLHV | MEVMSGGSLADVSHKFGGSLNEDVVRQYTRQIVHGLHHHGH | GIVHCDLRCKNVLVASS--GIV | ----- | ----- |
| NP-172195 | 80 | HPYIVKFLGDDVSR | EGTTSE | RNLHLEVLPE | GDVANG | -----GKTVNEETLLRQYVWCLVSALEHHHANG | GIVHCDVRSKNVLVANGGSSV |
| NP-194419 | 55 | HPHVKYIGTCLTR | ESNGLV | NILMEVSGCNL | LDLTKNSGGKLEPE | PEIRSYTRQILNGLVYLHRCGIVHCDLRSHNVLV | EEN--GVL |
| MAPKK | 189 | PT-----AEK | IPRGSPLWMAPEV | VSREYVQ | ----- | PESDVWSLGCIVIEMLTGKPAWE | -----DPGFDLSLRIFESN |
| BRMAKKK | 170 | PT-----AEK | IPRGSPLWMAPEV | VSREYVQ | ----- | PESDVWSLGCIVIEMLTGKPAWE | -----DPGFDLSLRIFESN |
| ABE78950 | 162 | NMNMKSSSCIHANG | GTPLWMAPEV | LLMKHSSINDESRVVDFAAAD | HWSLGCTVIEMLTGKPAWE | -----DDDLISISNPMAMFKIACGD | ----- |
| NP-172195 | 178 | P-----RAL | ITPRGSPLWMAPEV | IRREYVQ | ----- | PESDVWSLGCIVIEMLTGKPAWE | -----DHGIDLSLRIFESN |
| NP-194419 | 154 | SE-----FSG | TPRMAPEV | ARCEPQR | ----- | FPADVVALGCTMIEMTCSSEWP | -----ELNDVVAAMVKIIFESG |
| MAPKK | 265 | RDFLDKCLKRD | RSQRWS | CDQLLEHPFL | CDDHHSLSL | -----TTESSPRC | VLDVWVSEFEEDIDEL--RVESMV |
| BRMAKKK | 246 | RDFLDKCLKRD | RSQRWS | CDQLLEHPFL | CDDHHSLSL | -----TTESSPRC | VLDVWVSEFEEDIDEL--RVESMV |
| ABE78950 | 262 | RDFLRRLCRD | PKRSTALE | LLRHFFLVS | ----- | TTLTHHKHYSASSPASVLEVHQFEDTYDDDD | ----- |
| NP-172195 | 253 | RDFLDKCLKRD | RSQRWS | CDQLLEHPFL | SQCINSS | -----PTESSPRC | VLDVWVSGFDLEEEEEEVRSFE |
| NP-194419 | 227 | KDFLKNCLKED | QKRWIV | VEELLKHDFL | DDDEESQTS | DCLKNKTS | SSPSTVLDQRFWDS |
| MAPKK | 265 | RDFLDKCLKRD | RSQRWS | CDQLLEHPFL | CDDHHSLSL | -----TTESSPRC | VLDVWVSEFEEDIDEL--RVESMV |
| BRMAKKK | 246 | RDFLDKCLKRD | RSQRWS | CDQLLEHPFL | CDDHHSLSL | -----TTESSPRC | VLDVWVSEFEEDIDEL--RVESMV |
| ABE78950 | 262 | RDFLRRLCRD | PKRSTALE | LLRHFFLVS | ----- | TTLTHHKHYSASSPASVLEVHQFEDTYDDDD | ----- |
| NP-172195 | 253 | RDFLDKCLKRD | RSQRWS | CDQLLEHPFL | SQCINSS | -----PTESSPRC | VLDVWVSGFDLEEEEEEVRSFE |
| NP-194419 | 227 | KDFLKNCLKED | QKRWIV | VEELLKHDFL | DDDEESQTS | DCLKNKTS | SSPSTVLDQRFWDS |
| MAPKK | 360 | GNA | SESCAQWEYLS | SSLRVESE | LNMSPE | -----STES | STRVNE |
| BRMAKKK | 341 | GNA | SESCAQWEYLS | SSLRVESE | LNMSPE | -----STES | STRVNE |
| ABE78950 | 323 | DDD | SDDELIS | PAGGNHFF | ITK | -----ELLCP | QGT |
| NP-172195 | 346 | CHA | SEEGT | TMEYS | SGTRVSE | YNTSS | DPNDV |
| NP-194419 | 327 | DWD | TDDCGWI | QVR | CEKIK | ETEKRD | GD |
| MAPKK | 450 | KLR | KKKK | -----KI | WAI | RAS | RGS |
| BRMAKKK | 431 | KLR | KKKK | -----KI | ----- | ----- | ----- |
| ABE78950 | 373 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| NP-172195 | 446 | ETL | SFNH | SLKFC | LFA | HVIR | IGQ |
| NP-194419 | 420 | KMP | RTH | ----- | ----- | ----- | ----- |

Figure 2-25. Sequence analysis of *BrMAPK3*. Sequence alignment of the deduced protein sequences from *Brassica rapa BrMAPK3* and with the four most similar MAPKs from *Arabidopsis* and tobacco.

- MAPK(mitogen-activated protein kinase)의 발현

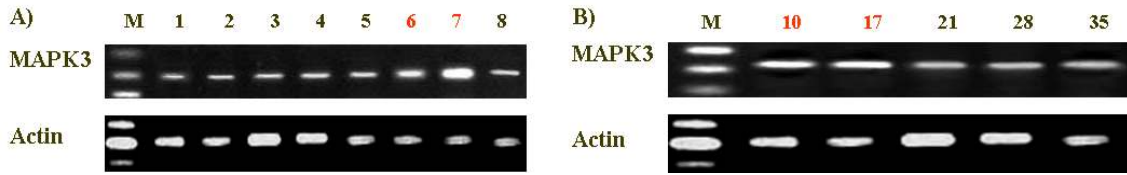


Figure 2-26. Expression of MAPK3 gene in Osome (*Brassica rapa* L) tissue semi-quantitative and developing stage RT-PCR was performed on total RNA of the various tissues and developing stage using gene-specific primers. (A). The constitutively expressed actin gene was used as an internal of RNA quantity. Lane M; Molecular marker, Lane 1; stigma, Lane 2; stamen, Lane 3; petal, Lane 4; calyx, Lane 5; flower stalk, Lane 6; mature leaf, Lane 7; stem, Lane 8; root. (B). Expression of MAPK genes in developing Osome (*Brassica rapa* L) of 10, 17, 21, 28 and 35 DGA respectively. The constitutively expressed actin gene was used as an internal control of RNA quantity.

- MAPK(mitogen-activated protein kinase)의 스트레스 반응

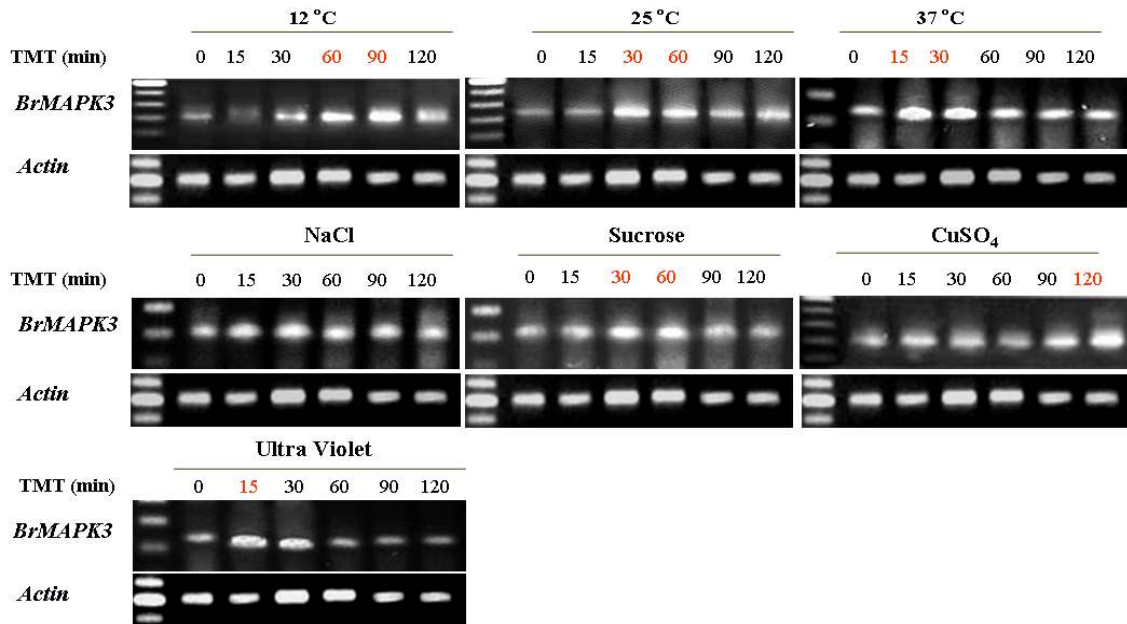


Figure 2-27. Activation of the MAPK1 transcript within 0 and 120 min in response to multiple stresses in *Brassica rapa* seedling leaves. Total RNA was extracted from leaf segments treated with 100 μ M each of CuSO_4 drought; 150 mM each of NaCl and sucrose; and UV-C irradiation (in vitro). CON refers to the wounding by cut control. Intact seedlings (in vivo) were placed at various temperatures (25/37/12 $^{\circ}\text{C}$). Arrowhead refers to sampling at the start of the experiments. (Treatment time-TMT)

4. 배추의 완전장 cDNA library로부터 4종의 ABC transporter 유전자 분리 및 분자적 특성

가. 서론

ABC(ATP-binding cassette) 수송체는 생체막을 통한 여러 가지 기질의 수송에 가담하는 다양한 기능을 가지고 있으며, 또한 세균에서 인간에 이르기까지 그 구조와 기능이 잘 보존된 가장 큰 유전자군을 이루는 단백질군이다. 기능면에서 보면, ABC 수송체는 ATP 의존적 pump뿐 아니라 이온통로 조절 활성을 가지고 있는 것으로 밝혀졌다. 현재 대장균에서 인간에 이르기까지 약 100 여종 이상의 ABC 수송체가 연구되었으며, 가장 많이 연구된 단백질의 예는 CFTR(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) 계열, MRP (multidrug resistance-associated proteins) 계열, MDR (multidrug resistance-related proteins) 계열 등이 있다. 이러한 단백질 계열은 식물의 경우에서도 차세대 연구대상 단백질군으로 주목받고 있다. Arabidopsis의 경우, 현재 유전체 사업의 결과로 150여 종의 ABC 수송체가 유전체에 존재하리라 예상되지만 유전자 분리 및 생리적 기능에 관한 연구는 매우 초보적이다.

ABC 수송체에 관한 연구가 필요한 이유는 이 단백질군이 가지고 있는 다양한 기능 때문이다. 즉, ABC 수송체는 다양한 기질의 수송에 관여하기 때문에 생명현상의 이해라는 학문적 요구와 활용범위가 광범위한 유전자군이다. ABC 수송체를 통해서 이동하는 기질의 종류로는 단백질류, 당류, 지질, 중금속 chelates, 다당류, 알칼로이드, 스테로이드, 무기산 및 글루타치온 결합체 등으로 다양하다. 이러한 기능의 ABC 수송체가 관여하는 요인으로 미루어 보아 식물에 있어서도 유전공학적 연구에 의해 염류 내성, 영양소 흡수, 제초제 내성, 중금속 수송 및 내성 등이 활용 가능한 기능들이다.

ABC 수송체는 ATP 가수분해에 의해 다양한 물질들을 세포막을 통하여 운반한다. 이러한 ABC 수송체는 박테리아, 식물 및 동물 등 어디에나 존재하며 거대 단백질군의 하나이다 (Higgins 등, 2000). ABC 수송체는 두 개의 소수성 세포막 부위(integral membrane domains; IM domains)와 두 개의 친수성 ATP결합 부위(ATP-binding cassette domains; ABC domains)구조를 이루고 있다. IM domain은 수송할 물질을 인식하는데 중요한 부위이고 ABC domain은 에너지를 생성하여 IM domain이 물질을 수송할 수 있도록 해주는 부위이다. ABC 수송체는 물질수송 외에 DNA수복, 전사 또는 유전자 발현 조절과 같은 세포 과정에도 관여를 한다. 기능적 특성과 구조에 따라 ABC 단백질은 3개로 분류된다.

통상 ABC단백질의 분류는 ABCISSE에서 제작한 자료에 의한다. Class 1은 대부분의 기능이 물질을 수송하여 배출하는 것으로 구성되어 있다. 즉 세포기관의 기질 또는 다양한 분자를 세포질에서 밖으로 배출하는데 관여하는 모든 ABC 수송체를 포함한다. ABC 수송체는 하나의 ABC와 IM domain이 결합한 half-size 수송체 구조와, 각각 두개의 ABC와 IM domain이 결합한 full-size 수송체 구조로 구분된다. 진핵생물에 있어서 class 1 단백질은 ABCB, ABCC, ABCD 및 ABCG 군으로 분류된다.

ABCB군은 지질이나 약제와 같은 다양한 기질의 배출에 관련된 기능을 하며, half-size 수송체의 HMT(similar to yeast heavy metal transporter), MDL(similar to yeast MDL protein), TAP(similar to the human transporter associated with antigen presentation) 아군과 full-size 수송체 P-gp(P-glycoprotein) 아군 구분된다. 특히 식물과 원핵생물은 LLP(lipid A-like exporters, putative) 아군 및 CCM(cytochrome c maturation) 아군을 갖고 있다. ABC군에서 대표적인 full-size 수송체 P-gp 아군은 다약제 내성(MDR; multidrug

resistance)에 관련된 단백질이다. P-glycoprotein의 발현이 증가되어 세포내로 유입된 화합물을 세포 밖으로 배출시키는 기능을 한다. 현재 게놈 프로젝트 연구로부터 벼에서 17개, 애기장대에서 22개의 MDR-like 유전자가 보고되었다. 애기장대에서 P-gp 기능을 가진 At2g36910(AtPgP1, AtMDR1)은 원형질막 단백질로 광 의존성 배축 신장에 관여하는 것으로 나타났다. 그러나 이것의 메카니즘은 알려지지 않았다.

ABCC군은 세포막을 통한 이온통로 조절과 다약제 내성 관련(similar to multidrug resistance-associated protein; MRP) 단백질이다. MRP 단백질은 독성화합물을 세포내에서 glutathione 또는 glucuronide와 결합하여 펌프를 한다. MRP 아군은 애기장대에서 10개, 벼에서 17개의 유전자가 보고되었다. AtMRP1은 다양한 화합물의 배출에 관여하며, 최근 보고된 AtMRP4와 AtMRP5는 뿌리 발달과 기공운동 조절기능을 하는 것으로 나타났다.

ABCG군은 half-size 수송체인 WITH(similar to Drosophila white protein) 아군과 full-size 수송체인 PDR(similar to yeast pleiotropic drug resistance protein) 아군으로 나뉜다. WITH 아군 단백질은 초파리 눈 색소인 white, brown, scarlet 단백질과 상동성을 나타냈다. 또한 벼에서 30개의 유전자가 확인되었다. 이 단백질은 세포질에서 물질대사의 중간생성물을 배출하는 기능을 한다. PDR 아군은 효모에서 처음 발견되었으며, 식물에서 쉽게 찾을 수 있다. 이 단백질은 oligomycin이나 cyclohexamide와 같은 세포장애 화합물을 배출하는 특성을 가진다. 벼에서 단리한 OsPDR9 유전자와 애기장대의 AtPDR12는 중금속을 해독시키거나 펌핑작용을 하여 배출하는 기능을 한다.

Class 2 단백질은 IM domain없이 두개의 ABC domain 구조를 가진 ABCE 와 ABCF 군으로 구성되어 있다. ABCE군은 RNase-L inhibitor에 관련된 유전자로서 동물 mRNA의 전사조절에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 식물에서는 보고된 바가 없다. ABCF군은 yeast GCN20 단백질과 *Agrobacterium tumefaciens* ChvD 단백질과 같은 유전자 발현을 조절한다. 이 단백질군은 진정세균류와 진핵생물에서 발견되었다.

Class 3 단백질은 원핵생물에서 소분자의 흡수에 관여하며, 결합형 단백질 의존성 수송체로만 알려져 왔다. 그러나 몇몇 class 3 단백질이 약제 저항성에 관련되어 있다고 하는 연구결과가 보고되면서 이 가설은 깨졌다. 그 예로 *Streptomyces fradiae*에서 항종양성 항생물질(doxorubicin)에 저항성을 나타냈다.

본 연구에서는 배추의('Osome')의 표준화된 완전장 cDNA library로부터 1) ABC 수송체 관련 유전자를 cloning하고, 2) 이미 보고된 유전자들과의 상동성 비교 및 구조분석을 하여 그 기능적 특성을 밝히고, 3) 해당 유전자들의 유전자 발현 조절 기전과 분자생물학적, 생리학적 기전을 규명하고자 한다.

나. 재료 및 방법

1) 식물재료 및 RNA 분리

배추('osome')를 12°C 이하의 저온을 일정기간 유지하여 꽃눈 분화를 유도하였다. 개화 전 기관별로 조직을 수집하였다. 배추의 기관별(암술, 수술, 꽃잎, 꽃받침, 꽃자루, 꽃대, 본엽, 뿌리) 조직을 500mg~100mg 채취하여 TRIzol 방법을 이용하여 mRNA를 추출하였다.

2) cDNA의 5' 및 3'말단의 염기서열 결정

Plasmid DNA를 RNase A 처리 후, 추출하였다. DNA 염기서열은 BigDye^R Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystem사)를 이용하여 cDNA의 5'말단 및 3'말단의 sequence반응을 하였다. 반응액을 DNA analyzer ABI3700(Applied Biosystem사)로 전기영

동하여 해석하였다. 5'말단배열 결정용 primer(M13-21 seq. primer)로서는 5'-TGTAAC ACGACGGCCAGT-3', 3'말단배열 결정용 primer로서는 RV-M primer; 5'-AGCGGATAAC AATTTTCACACAGGA-3' 혹은 T7 promoter primer를 사용하였다. 염기서열의 상동성은 BLAST를 이용하여 분석하였다.

3) 아미노산 배열 상동성 비교 및 계통 분석

유전자 염기배열을 토대로 아미노산 배열을 결정하였으며, 유전자간 상동성 비교는 인터넷을 이용한 Blast(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 분석에 의하여 실시하였다. 계통분석은 CLUSTALW(<http://hypnig.nig.ac.jp>)를 통해 분석하였다.

4) Southern blot 분석

Southern blot 분석을 위한 DNA 추출은 1g의 잎 조직을 유발에 액체질소와 함께 넣어 마쇄한 후, DNA추출 용액(200mM Tris-HCl pH 8.0, 500mM NaCl, 25mM EDTA, Sodium bisulfate 0.38g/100ml) 1ml를 첨가하여 유봉으로 잘 혼합한 후, chloroform : isoamyl alcohol(24:1) 1ml를 첨가하여 10분간 흔들어 잘 혼합한 다음 3,500rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 분리한 후 동일 양의 phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1)를 첨가하여 10회 정도 흔들어 준 후, 12,000rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 상등액을 새로운 1.5ml tube에 옮긴 다음 2µl의 RNase(10mg/l)를 넣고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 2/3-1 volume의 isopropanol을 첨가하여 DNA를 응축시킨 다음 12,000rpm으로 10분간 원심분리 하여 DNA를 침전시킨 후, 70% 에탄올로 세척하여, 12,000rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 상등액을 버리고 DNA를 풍건시킨 다음 70µl의 TE에 DNA를 녹여서 southern blot 분석에 사용하였다. 20 µl의 total DNA를 0.8% agarose gel에서 전기영동한 후, nylon membrane(Hybond-N, Amersham)에 transfer시켰다. DNA가 전이된 membrane을 filter paper 위에 올려놓고 UV transilluminator로 2분간 cross-linking시켰다. Pre-hybridization은 6 × SSC, 5% dextran sulfate, 0.1% SDS 용액을 넣고 60°C에서 2 시간 동안 수행하였으며, sst 및 fft 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set 의해 증폭된 DNA를 ³²P로 labelling한 probe와 하루밤 hybridization시켰다. Membrane의 세척은 2 × SSC, 0.1% SDS 용액으로 실온에서 5 분씩 2 회, 0.5 × SSC, 0.1% SDS 용액으로 65 °C에서 15 분간, 0.1 × SSC, 0.1% SDS 용액으로 65 °C에서 15분간 세척한 후, X-ray film (Kodak)에 감광시켜 band를 확인하였다.

5) RT-PCR 분석

Total RNA 1µg/µl을 template로 하여 RT-PCR kit(Promega, USA)를 이용하여 수행하였다. PCR 조건은 48°C에서 45분간 RNA를 역전사시켜 cDNA를 합성하였고 94°C에서 2분간 pre-denaturation 시킨후 94°C에서 30초 동안 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing 그리고 68°C에서 2분간 extension 과정을 35cycle을 수행하였고, 마지막으로 68°C에서 10분간 최종 연장시키도록 하였다. 최종 PCR산물은 1.5% agarose gel 상에서 전기영동으로 분리하여 ethidium bromide로 염색을 하여 확인하였다.

다. 결과 및 고찰

1) ABC(ATP-binding cassette) 수송체의 염기서열 분석 및 BlastX 분석

ABC(ATP-binding cassette)단백질은 모든 생물에서 발견되어지고 있으며, 거대한 superfamily를 이루고 있다. 최근 식물의 plasma membrane위치하는 것으로 밝혀진 ABC transporter의 대부분은 cytotoxin의 세포내 sequestration에 관여한다고 알려졌다. 배추의 표

준화된 완전장 cDNA library로부터 ABC transporter 유전자를 탐색, cloning하였다. Clone no. 14, no. 261, 272 및 289의 염기서열을 결정하여 아미노산배열로 치환하였다(Fig. 2-23). mRNA의 poly A 뒤에 tag한 염기서열로부터 clone no. 14 유전자는 화아조직(TACG) 유래, clone no. 261, 272 및 289 유전자들은 엽육조직(CATG) 유래인 것을 알았다. No. 14 유전자는 1,350 bp의 완전장 cDNA였으며, 5' UTR 00 bp, 3' UTR 00 bp구성되어 있었다. No. 261 유전자는 2,061 bp의 완전장 cDNA였으며, 5' UTR 99 bp, 3' UTR 109 bp구성되어 있었다. No. 272 유전자는 3,900 bp의 완전장 cDNA였으며, 5' UTR 00 bp, 3' UTR 00 bp구성되어 있었다. No. 289 유전자는 2,124 bp의 완전장 cDNA였으며, 5' UTR 00 bp, 3' UTR 00 bp구성되어 있었다.

BlastX 분석결과, No. 14 유전자는 Arabidopsis의 세포막 결합형 유전자인 ATPase(NP_564383.1)와 95%의 상동성을 나타냈다. No. 261 유전자는 *Brassica rapa*(cv. pekinensis)의 세포막 결합형 유전자인 ATPase(AAZ41825.1)와 99%의 상동성을 나타냈다. No. 272 유전자는 Arabidopsis의 camodulin 결합형 유전자인 ATPGP1(NP_181228.1)와 95%의 상동성을 나타냈다. No. 289 유전자는 Arabidopsis의 세포막 결합형 유전자인 ATPase(NP_191071.1)와 83%의 상동성을 나타냈다.

No.14

```
AATAAGAOGAGTAAGGAAACTGGTTCAGGATOCATCATGCCACAGAACTGCATAGCAOCCAGGCOCTGAAGAAAGTGGCAGTGGCG
AAGOCATGGTACAAGGTTTGACAGATATGTCAGAAACACAGAGCAAGTCTGTACAAGTCTCCAGCTGTCCATGTACCCATAACT
CTCAAGTTTGAGGAGGTTGTGTACAAGGTTAAGATAGAGCAGACAGGTCAGTGTGGGATCATGGAGCTGCCAAGAGAAGACAA
TTCTGAAOGGGATAACGGGTATGGTTGTCCAGGAGAGATTCTAGCTATGTTAGGTCCATCAGGCAGTGGCAAAOCCACTCTTCT
CTCAGCTCTCGGGGCOGCTCTCCAAAACCTTCTCGGGGAAAGTTCATGTACAACGGCCAGOCCTTCTCTGGCTGCATCAAGGG
AGAACAGGGTTTGTGTCTCAGGATGATATOCCTCAOCCCAOCCCAOCCGTTTGGGAGACTCTCTTCTTACTGCGCTTCTAOCGGC
TAOCCAAAGCAGTTTGACAAGAGAOCGAGAAGGCTGAGCATGTGGAOCCAGTTATCTCTGAACTOCCGATTGACTOCCGTTACTAACAG
CATGATAGGAGGACCCTGTTTCAGAGGAATATCAGGAGGGGAGAAAAAAGAGTTAGCATTGGTCAAGAAATGCTCATCAATOCCT
AGCTTGCCTCCTTGTATGAOCCACTTCAGGTCCTGACTOCCACTGCTCATCCGATOCGTGAOCCAAATTAAGOCCGCTGGCTT
CTGGGGGAAGGACAGTAGTCAOCCAAATTCATCAGCCATCAAGCOCCATATAOCCATATGTTTACAAGGTGGTTTGTCTGTCTGA
AGGTAGTCTATTTATTATGGTCTGCATCTTCCGCTATGGAATATTTTCAGCTCTGTTGGATTCTCTACTAOCATGACAGTTAAC
CCAGCTGACCTTTTACTTGAOCCGTGCAAAACGGAATACCAOCCGATTTCTCAAAGGAGACATCAGAAACAAGAACAGAAAGACAGTGA
AAGAACTCTTGTTCAGCTTATGAGAAGAACATATCTACTAAACTGAAAGCTGAACTCTGCAATGCAGATTCTCATAGCTATGA
GTACACAAAGCTGCTGCAAAAAGTATCAAGTCAGAACAGTGGTGCACAACCTTGGTGGTAOCCAGTTCACTGTACTGTCCAAAGA
GGGTCAAAAGAGGAGATTGAAATCTTCAACAAGCTAAGGATTTTCCAAAGTCATCAGOGTGGCTTTCCTTGGTGGCCTACTCT
GGTGGCATACTOCCAAATCTCAOCTACAAGATAGAAGTGOCTTGTCTTCTTCTCAGTCTTTGGGGTCTCAOCCACTATA
CAAOGCGGTTTTACATTTCCCAAGAGAAGAGAATGCTAATCAAGGAGOGGCTTCCGGAATGTACOGTCTTTCCTCTATTTT
ATGGCTAGAAACATTTGGAGACCTGCOOCTTGGAACTGCOOCTTCCAACTGCTTTGTGTTCATAATTTACTGGATGGGTGGGCTCAA
ACCTGAOCCACTACATTTATOCCTCTCACTACTGGTGGTCTCTATTCOGTCTGTTGCTCAAGGCTTGGCTTAGOCTTGGT
GCTCTCCTTATGAACATCAAGCAAGCCACAACATTTGGCTCTGTTACTACACTTGTGTTTCTCATAGCTGGAGGGTATTACGTTT
AGCAAATTOOCTOCTTTCATCGTATGGCTCAAGTACCTAAGCTATAGCTACTACTGCTACAAGCTGCTTTTGGGTATTCAATACAG
TGATGAGGATTACTACGAGTGTCTCAGAAGGGGTATGGTGCAGAGTTGGAGACTTCCAGGAATCAAGCCATGGGACTGAACAAT
TTATGGATAGAGTACTTGTATGGGAGTTATGCTGGTGGTATCGACTCATGGCATACATGGCACTGCATCGAGTGAAGTTGA
GGTAAAAAGATGCAGCCAGAAGAATAAATATTTGCCACACTGCAACCAAGGAATAATATTAGTATCAGAAAAAGTTAATAAG
TOGTCGAATTTGGTGTATTTACTTAAGTATCOGAGATATATCOGACACTTCTTTTGTGTTTAGGCTTTAGATGATAATTA
TACTCCTAAGTTTGAGAATAAAACACTGAGATGATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAATACG
```

```
atgtaccccataactctcaagtttgaggaggttggtgtacaagggttaagatagagcagaca 60
M Y P I T L K F E E V V Y K V K I E Q T
ggtcagtgttgggatcatggagctgcaaagagaagacaattctgaacgggataacgggt 120
G Q C L G S W S C K E K T I L N G I T G
atggttggtccaggagagattctagctatgtaggtccatcaggcagtgggcaaaaccact 180
M V C P G E I L A M L G P S G S G K T T
cttctctcagctctcgggggcccgcctctccaaaactttctcggggaaagtcagtgtacaac 240
L L S A L G G R L S K T F S G K V M Y N
ggccagcctttctcggctgcatcaagcggagaacagggttggtgctcaggatgatatc 300
G Q P F S G C I K R R T G F V A Q D D I
```


ATGCAAGGCCAGCAAGAAGCTCCAGAGATGGAACTGAAACACTGAAAGGAGTCTGAGAGAGATATATATTCTTATAAGAAACAG
TCCTCTTACATGTTTATTTTGTGGATTGAGTTTGTATAGTTAGTTATACITTTTTTTCAGTTTAAGGAACGATTAAGAAAAAAAAA
AAAACATG

ATGGGTTTTATCCACGAACCTCCACACCCATCAACCTCCGCTCCACTCTCTTCCCGGGCGGC 60
M G L S T N L H T I N L R S T L F P G G
CTCCGCCCATCTCCAAACTTCATCAAAGTCTCCTCCTTTCCAATCCCTAGACGCGAAGCC 120
L R P S P N F I K V S S F P I P R R E A
ACCCCCACAATCAGATCATCCCAACTCTCCACAATCGCCCCCGTAAAAGAGCAACAAAAC 180
T P T I R S S Q L S T I A P V K E Q Q N
GAGTTCGAATCACTCTTCTCCACCCCAACGTCCCAACAAGACTCCGACCGCAAAACGAAAC 240
D V E S L F S T P T S Q Q D S D R K R N
AACGGAAAAAACTCCTCCTCCGGCGTCTCCTCCGGCGTCAAGCTCGAGAACATAAGCAA 300
N G K N S S S G V S S G V K L E N I S K
ACCTACAAAGGCCAACCCTCCTCAAAGACGTCTCCTGGGAGGTGAAGCGCGGGCGAGAAA 360
T Y K G L T V L K D V S W E V K R G E K
GTAGGCTTGGTCCGGCGTCAACGGCGCGGGCAAAACGACGCAGCTTCGAATCATAACGGGC 420
V G L V G V N G A G K T T Q L R I I T G
CAAGAGGAGCCCCGACTCGGGCCACGTGATCAAGGCCCGCCCAATATGAAAGTGGCCTTTG 480
Q E E P D S G H V I K A R P N M K V A F
TTGAGCCAGGAGTTCGAGGTGTCTATGAGCAGGACGGTTAAGGAGGAGTTCATGAGCGCC 540
L S Q E F E V S M S R T V K E E F M S A
TTCAAGGAGGAGATGGAGGTTGCTGATAAGCTCGAGAGAGTTCAGAAGGCTATCGAGGGT 600
F K E E M E V A D K L E R V Q K A I E G
TCGGTTGATGATTTGGAGCTCATGGGGAGGTTGCTTGATGAGTTTGATTTGCTGCAGAGG 660
S V D D L E L M G R L L D E F D L L Q R
AGGGCTCAGGCTGTGAGTTTGGATAGTGTGATGCTAAGATTAGTAAGCTGATGCOGGAG 720
R A Q A V S L D S V D A K I S K L M P E
CTGGGGTTTTGCGGCAGAGGATGCTGATAGGCTTGTGGCTTCGTTTAGTGGTGGGTGGCAG 780
L G F A A E D A D R L V A S F S G G W Q
ATGAGGATGTCGCTTGGGAAGATTCTGCTTCAGGATCCTGATTTGCTGCTACTOGATGAA 840
M R M S L G K I L L Q D P D L L L L D E
CCTACAAACCATTTGGATCTCGACACCCATCGAATGGCTTGAAGGCTATTTGCAAAAGCAA 900
P T N H L D L D T I E W L E G Y L Q K Q
GAGGTTCCCATGGTCATCATCTCACACGACAGAGCCTTCCCTOGATCAGCTCTGCACCAA 960
E V P M V I I S H D R A F L D Q L C T K
ATCGTGGAAACCGAGATGGGTGTCTCCAGGACATTGGAAGGCAACTACTCGCAGTAOGTC 1020
I V E T E M G V S R T F E G N Y S Q Y V
ATCTCCAAAGCAGAGTGGATAGAACTCAGAAACGAGCTTGGGAGAAGCAGCAGAAAGAG 1080
I S K A E W I E T Q N A A W E K Q Q K E
ATCGAATCAACTAAGGACTTAATCGCTAGGCTCGGTGCTGGTGCAAACTCTGGCOGTGCT 1140
I E S T K D L I A R L G A G A N S G R A
TCCACTGCAGAAAAGAACTAGAGAAGCTGCAAGAGCAGGAGCTTATAGAGAAGCCTTTC 1200
S T A E K K L E K L Q E Q E L I E K P F
CAGAGGAAGCAGATGAAGATCAGGTTTCTGAGCGTGGGACTAGTGAAGATCTGTAGTC 1260
Q R K Q M K I R F P E R G T S G R S V V
ACGGTTAAGAACGTTGATTTTGGTTTTGAGGATAAGATGCTGTTCAAGAAGGCGAATCTA 1320
T V K N V D F G F E D K M L F K K A N L
GOGATAGAGAGAGGAGAGAAGATTGCTATCATTGGCCCCAACGGGTGTGGCAAAAGCAOG 1380
A I E R G E K I A I I G P N G C G K S T
TTGCTGAAGCTTATAATGGGTTTAGAGAAGCCAAACAAAGGTGAAGTTATACTTGGAGAG 1440
L L K L I M G L E K P T K G E V I L G E
CACAATGTATTACCAAACTACTTTGAACAGAACCAGGCTGAGGTTCTTGATTTGGATAAG 1500
H N V L P N Y F E Q N Q A E V L D L D K
ACAGTTCTTGAAACGGTTTGTGAAGCTGCGGAAGACTGGAGAAGTGAAGTGAAGTGAAGG 1560

COCTGATOCAGAGATTCTAOGAAOCGTOCTCAGGCOGAGTCTTGATAGACGGTAAAGACATAAGGAAGTACAATTTGAAGGOCAT
AAGGAAACACATAGOCATAGTCCOCTCAAGAGOCCTTGCTTGTTOGGCAOGACAATATAOGAAAACATOGCATAOGGACAOGAATGC
GOGACAGAAAGCAGAGATCATAACAAGCOGCAOCGCTAGCCAGOGGOCACAAAGTTCATATCCGGGTTGOCCTGATGGCTACAAGACTT
ATGTCGGAGAGAGAGGGGTTACGCTGTGGGAGGACAGAAACAGAGGATAGCGATAGCACGTCGCTTGGTGAGGAAGGCAGAGAT
CATGCTGCTOGATGAGGOCACAAGTGCCTCTTGATGCAGAGTACAGAGAGGTCGGTGCAGAGGGGTTGGAOCAGGCTTGTCTGGT
AGAACATCTATTGTGCTGGCTCATAGGTTGTCTACAATCAGGAACGCACACGTCGATCGGGTGAATGATGATGGTAAAGTTGTGG
AACAAGGATOGCATTGGCATCTTCTCAAGAACTATCCCGATGGAATCTAOCGOGAGGATGATACAGTTGCAGAGGTTTACGCATAC
TCAGGTGATTGGTATGAOCTCAGGGTGGAGTTCTAGGGTTAAGGAAGATGATGCTTAGTACTTGGTAAATATAGAAGA
AGAGAGAACAGAGTTGAAAAAAGACAAACOGCACTACTAGAACATGTTCTGTATAAACTCTCGAGCTCATTCTTCTCTT
TTTATGTTGTAATTTGAGGTTACTTTATTTTGAAGTACGTTTCAGAAATTGATGGTATAGTATTATTATTATTGTGATTATTA
TGAGTAATCTAATTGTTTCATCTGTGTAATATCAGTTTATCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAACATG

atgcaaggacttgagcttctccctgaaccttctcaaatagtaacagcaactcaagaaac 60
M Q G L E L L P E P S S N S N S N S R N
ccagaacagagctccaagaacatccgccggagatgggaaacggcgggtggtactcctcct 120
P E T E L Q E H P P E M G N G G G T P P
cctcctcctccggcaacagttgaggagcctaataaaagcagagattcgtggagttgcgctc 180
P P P P A T V E E P K K A E I R G V A F
aaagagctttcagattcgcagatgggttagattatgtactgatgacaattggctcgtt 240
K E L F R F A D G L D Y V L M T I G S V
ggctcttcgaccggtcgtctttgcctcgttctcagattcttcgcccgatctcgtg 300
G A F V H G C S L P L F L R F F A D L V
aactcctcggttctaacgctaataacgctcgacaagatgatgcaagaagtctcaagat 360
N S F G S N A N N V D K M M Q E V L K Y
gcgcttactttctgtcgttgggtgctgcaactcgtggctcctcctgggcagagattcg 420
A L Y F L V V G A A I W A S S W A E I S
tgttgatgtggactggagagagacaacaacgaagatgaggataaagtacttagaagct 480
C W M W T G E R Q T T K M R I K Y L E A
gctttaaaccaagacattcagttcttcgacacagaggttcgaactcagatgtgtctcc 540
A L N Q D I Q F F D T E V R T S D V V S
gccattaacaccgacgctgttatgggtcaagacgccatcagcgagaaattgggtaacttc 600
A I N T D A V M V Q D A I S E K L G N F
atccattacatggcgttgggtgactatcgcgggtggttccggtgatagctgtgatcgggag 660
I H Y M A L V T I A V V P L I A V I G G
atccacaccacaactctcttaagctctcttaacaagagtcaggagtctctttcacaagct 720
I H T T T L S K L S N K S Q E S L S Q A
ggtaatatcgtcgaacagacagtggtacagatcagggtagtaattggctttgtcggagag 780
G N I V E Q T V V Q I R V V M A F V G E
tcaagagcctctcaagcttactcatcagcttgaagacagctcagaaactcggttacaaa 840
S R A S Q A Y S S A L K T A Q K L G Y K
acaggtttcgctaaaggaatgggacttggcgcgacttactcgtcgtcttctgttgctac 900
T G F A K G M G L G A T Y F V V F C C Y
gctccttgcctggtacggtggctatctcgtccgccaccatttgaccaacgggtggtctc 960
A L L L W Y G G Y L V R H H L T N G G L
gctatagccaccatggtcggcgtcatgatcgggtgggtggggtgggacaatcagtaccg 1020
A I A T M F A V M I G G L G L G Q S V P
agcatggctgcggttgcgaaagctaaagtgtcgtcgtcgaagatctttagaatcattgat 1080
S M A A F A K A K V A A A K I F R I I D
cacaagccaacgatagagcgtaacagcgagtcggcggtggagctagagtctgtcacgggt 1140
H K P T I E R N S E S G V E L E S V T G
ctcgtcagacttaaaaacggttgcactttcgtaccgctcaagaccagatgtaagatcctt 1200
L V E L K N V D F S Y P S R P D V K I L
aacgacttcacactctctgtaccgcccgggaagactatagcttgggtcgggaagcagtggt 1260
N D F T L S V P A G K T I A L V G S S G
tcgggcaaaagcactgtcgtttcgttatcagagcgggttttacgaccgacctcaggacaa 1320
S G K S T V V S L I E R F Y D P T S G Q

gtttactagatgggcacgacctgaagacactgaagctcaaatggtaagacaacagatc 1380
 V L L D G H D L K T L K L K W L R Q Q I
 ggtcttgtagccaagaaccagccttggtcgccacttccatcaaagagaataactctta 1440
 G L V S Q E P A L F A T S I K E N I L L
 ggccgtccagacgcagatcaagtcgaggtagaagaagcagctcgagtcgcaaagtctcat 1500
 G R P D A D Q V E V E E A A R V A N A H
 tcctcatcatcaaactacctgatggcctcgacacacaggtggggagagaggactgcag 1560
 S F I I K L P D G F D T Q V G E R G L Q
 cttcaggtggacagaagcaagaatagcgatagcaagagccatgtaagaacccggcg 1620
 L S G G Q K Q R I A I A R A M L K N P A
 atactttactagatgaagccacaagcgtttggattctgaatcagagaagctagtgcag 1680
 I L L L D E A T S A L D S E S E K L V Q
 gaagctttggaccgtttcatgataggaaggacgactctaatacatcgctcaccgtctctcc 1740
 E A L D R F M I G R T T L I I A H R L S
 accatccgcaaagctgaccitgtagctgtgcttcagcaaggaagtgtctccgagattggt 1800
 T I R K A D L V A V L Q Q G S V S E I G
 actcacgacgagcttttcgccaaggagagaatggatctactctaagcttattaaatg 1860
 T H D E L F A K G E N G I Y S K L I K M
 caagaggcagctcatgaaacggctatgaacaacgcaagaaagagtagtgctagaccgtct 1920
 Q E A A H E T A M N N A R K S S A R P S
 agtgctagaaactcgggttagctcaccgataatagctcggaaactcttctatggaaggta 1980
 S A R N S V S S P I I A R N S S Y G R S
 ccgtactcacggagactctccgactctcaactactgacttcagcctctccgtcgaagct 2040
 P Y S R R L S D F S T T D F S L S V E A
 tctcatacccaactaccgacacgataagctacccttcaaggaccaagccaactcctc 2100
 S S Y P N Y R H D K L P F K D Q A N S F
 tggcggctagcgaaaatgaactctccggagtggaaagtacgctctcgctcgggtctgtaggc 2160
 W R L A K M N S P E W K Y A L V G S V G
 tcagtcactctgcggtcactcagcgccttcttgcatacgtcctcagcgcggctcctaagc 2220
 S V I C G S L S A F F A Y V L S A V L S
 atctactacaaccggaccacaattacatgatcaaacagattgataaatactgttacctc 2280
 I Y Y N P D H N Y M I K Q I D K Y C Y L
 ttgatcggctctctcttctgcggtctcatcttcaacacgctccagcattcttctggggac 2340
 L I G L S S A A L I F N T L Q H S F W D
 attgtgggggagaatctcaccaagaggggtccgtgagaagatgcttaccgctgtgctcaag 2400
 I V G E N L T K R V R E K M L T A V L K
 aacgagatggcttgggttgatcaagaggagaatgagagcgcgagaatctcggcgaggttg 2460
 N E M A W F D Q E E N E S A R I S A R L
 gctcttgatgctaataacgtgagatcagctataggagataggatctcgggtcattgtgcag 2520
 A L D A N N V R S A I G D R I S V I V Q
 aacacagcgttgatgcttggcttgcactgctgggttggcttgcgaatggagactcgct 2580
 N T A L M L V A C T A G F V L Q W R L A
 ctctcttggctcgcagctctccctgtagtgttgcgaaccgctttacagaaaatgttc 2640
 L V L V A V F P V V V A A T V L Q K M F
 atgactggattctctggagaccttgaagcagcgcagcgaaggggaacacagctcgcgtgg 2700
 M T G F S G D L E A A H A K G T Q L A G
 gaagccatagctaagtgcagaacagtcgcagccttaactcagaagcaagattgttcgt 2760
 E A I A N V R T V A A F N S E A K I V R
 ctctacactgcaaacctgcaaccaccggtgaaacgctgcttctggaaaggacagatagct 2820
 L Y T A N L E P P L K R C F W K G Q I A
 ggaagtggctacgggtgtagctcagttctgtctctacgcatcttacgctctagggctatgg 2880
 G S G Y G V A Q F C L Y A S Y A L G L W
 tacgctcgtggcttgtgaaacacggaatctccgacttctccaaaaccataagagtcttc 2940
 Y A S W L V K H G I S D F S K T I R V F

atggttctgatgggtctcagctaattggcgcagcagagacgctcacattagctcctgattc 3000
M V L M V S A N G A A E T L T L A P D F
atcaaaggtggtcaggcaatgaggtcggtttcgaacttcttgatcgaaaaccgagatc 3060
I K G G Q A M R S V F E L L D R K T E I
gaaccggatgatcttgacaccacgcccgggtccagaccggttacgcggcgaagtggagctg 3120
E P D D L D T T P V P D R L R G E V E L
aaacacattgattctcttacccttctagaccagacattcaagtttccgtgacctagc 3180
K H I D F S Y P S R P D I Q V F R D L S
cttcgcgctagagctggcaagactttggccctgtcgggtccgagcgggtgcggtaaaagc 3240
L R A R A G K T L A L V G P S G C G K S
tcagtcatctccctgatccagagattctacgaaccgtcctcaggccgagcttgatagac 3300
S V I S L I Q R F Y E P S S G R V L I D
ggtaaagacataaggaagtacaatttgaaggccataaggaacacatagccatagtcctc 3360
G K D I R K Y N L K A I R K H I A I V P
caagagccttgcttggcgcagcacaatatacgaaaacatcgcatacggacacgaatgc 3420
Q E P C L F G T T I Y E N I A Y G H E C
gcgacagaagcagagatcatacaagccgcaacgctagccagcgcgcacaagttcataatcc 3480
A T E A E I I Q A A T L A S A H K F I S
gcgttgctgatggctacaagacttatgtcggagagagaggcgttcagctgtcgggagga 3540
A L P D G Y K T Y V G E R G V Q L S G G
cagaaacagaggatagcgcgatagcacgtgccttggtaggaaggcagagatcatgctgctc 3600
Q K Q R I A I A R A L V R K A E I M L L
gatgaggccacaagtgctcttgatgcagagtcagagaggtcgggtgcaagaggcgttgac 3660
D E A T S A L D A E S E R S V Q E A L D
caggcttgttctggtagaacatctattgtcgtggctcataggttgtctacaatcaggaac 3720
Q A C S G R T S I V V A H R L S T I R N
gcacacgtgatcgcgggtgattgatgatggttaaagttgtggaacaaggatcgattcgcat 3780
A H V I A V I D D G K V V E Q G S H S H
cttctcaagaactatcccgatggaatctacgcgaggatgatacagttgcagaggtttacg 3840
L L K N Y P D G I Y A R M I Q L Q R F T
catactcaggtgattggtatgacgtcaggggtcaggttctaggggtaaggaagatgatgct 3900
H T Q V I G M T S G S S S R V K E D D A

No. 289

GGCTCATACCAAAAAGTGAACACAGATATGTCTTTAGCTCCCGAAAGAAGATAACTGAAAGAAAAACAAGGTTTCCACTTGT
ACAGTGATACTTCACTGTTAGCTTCATCTCOAAGAATAAGCCATTTTCTCTGTAAAGATGCOAAGTGTTCGCTGAATCCCAA
GAAATATCATTGACGGGGCAGOGAACCAGCTOAGAGCTOCTGAAAGATTTGACGGAGGTGACOGGAAAAAACTCCG
GOGAAGATGCTTCCACTCATTACATACTTGATCTCACTTCCCTGAAACAAGACCAGTACCATTTCCTTGTCTTCAACAACCT
CAGCTACGACATCGTAAATOGCGGGGTTTGACTTCTCTOGAGGAAAGOCAGCTTCAGTGAACCTCTACTCAACGATGTTTCC
GGGAGGCTTGGACGGAGACATCTAGCCGTTCTGGAGCAAGGGAGOGGAAAGTCCAGTTGATOGACOGGCTAGCGGGAC
GAGTGGGTAGCTTGAGAGGCACGGTAACTCTAAACGGAGAGAAGATCTTGCAAACTCGTTTGCTGAAAGTGATATCAGCTTACGT
CATGCAAGAAGATCTTTGTTCCCGATGCTCAACCGTCAAAGAACTCTAATGTTGCTTCAGAGTTTGTCTCCCGAGAAGCTTG
TCCAAGTCCAAGAAAATGGAGCGTGTTCAAAACCTAATAGACCAGTTAGGGCTCAGAGAGCGOOGGATAOGATAATAGGAGACG
AAGGTCAACCGTGGAGTCTCCGGTGGAGAGCGGGCGCGTGTGATAGGAATOGATATCACCAGCCATCTCTTGTTCCT
TGATGAAOCTACGTCCGGGTTGGATTCAACCAAGCGTTTATGGTGGTGCAGGTTCTTAAACGTATAGCTAGGAGTGGTAGTATC
GTAATTATGACAATAACATCAACCTAGCGGTGAGTTCTTGACTTGCCTTGATOGTCTTATCATCTTATCTOGOGGOGAGAATGTTT
TCAGCGGTTCTCCGACAAGTCTTCCCTCAGTTCTTGCTGATTTCCGACATCCTATCCCGGAGAAAAGAGAACAATAACCGAGTTCCG
ACTTGAOCTAGTTCCGGCAGCTCGAAGGAGCTGGTGAAGGAACAGAGAGTTAGTTGAGTTCAACGAGAAGTGGCAACAGAAACAA
TCCGCTOGAGOCACGCCAATGACCACACCTTACCAAGCCTTGTCTCTAAAAGAATCCATTACCGCAAGTGTTCGAGAGGCAAGC
TAGTCTCCGGTTCAACCGATTCGATCCAAATTTCCATGGACTCAGTATCTTCAACGCAAAACCGGOCACCTGGTCCGAGACCTTTAT
CTTAGCCAAAACGGTACATGAAAACTGGATCCGGACACCCAGCTCATAGGGACAAGGATGGCCACTGTTCATGGTGACTGGTCTT
CTCTTAGCTACTATATACTGGAGGCTTGACAACACTCCAAAGGTTGCACAAGAGOGGATGGCTTTCTTTGCAATTTGGCATGTGCA
CAATGTTCTACGTTCTGTGGGACAACGTTCCCTGTTTTCTCAAAGAACGGTTCAATTTCTTGAGAGAGTCAACOGGCAACGCATA
CAGAATATCTTGTATGTCATCTCTCACTCTCTGTCTCTCTGCTCAGCTACTOGCTCTCTCCATOGCATTTGCTGOGAACAAG
TTCTGGACTGTTGGTTTGAGOGGTGGACTAGAGAGCTTTCTCTATTACTGCTCATAATCTAOCGAGGGTTTTGGTCCGGATCCT
CTTTTGTCAACCTTTGTGTCGGTTTTGGTTCCGAATGTGATGATAAGTTTCATGATCACTATTGCCTATCTTCTACTGTCTACT
CTTGGGTGGATTCTACATTAACCGGGATOGGATAACGGTTTACTGGATATGGTTTTCAATTTCAATTTGATTGAAGTATCCCTAC
GAAGCTGTCTTGATCAACGAGTTTGATGAOCCATCTCGTTGTTTTGTTAGAGGAGTCCAAGTGTTTGATGGAACGCTTTTGGCGA

AAGTGCCTGATGOGATGAAGGTTAAGCTOCTCGATACACTGAGTAGCTCTTTAGGAACAACGATAACGGAGTCCACATGCTTGAG
AACAGGGGCTGACTTACTTTTGAACAAGGTATTTCTCAGTTGAGCAAATGGGATTGCTTGTGGATTACGTTAGCTTGGGGTCTC
TTCTTTAGGATCTTATTTTACTTCTCTTTGCTGTTTGGGAAGCAAGAATAAGAGGACGTGAAGATTGTCCACAGCACACAAGCAT
ATATACTTCCGTTGGGCGTCAGTTTTCATATACACATTTAAGTGAAGCTTGAAGCTTCCAAGTCTAAAAAAGATGTAGTTTTTGT
AATCAAGTTGTAATTTTAGTAACTGTTTCATATGTTTGTATCCTTTTCTGAATATTGTCAAACATACATTTCTCAAAAAA
AAAAAACATG

atgccacgtgtttctgctgaatcccaagaaatatcattcgacggcggcagcgaaccgacg 60
M P R V S A E S Q E I S F D G G S E P T
ctcggagagctcctgaaagatttcgacggaggtagccggaaaaaaactccggcgaagat 120
L G E L L K D F D G G D R K K N S G E D
gttcgcactcaacatactgatctcactcccctgaaacaagaccagtaccatttctc 180
A S T H H I L D L T S P E T R P V P F L
ttgtcctcaacaacctcagctacgacatcgtaaatcgccggcgggttgacttctctcga 240
L S F N N L S Y D I V N R R R F D F S R
ggaaagccagctcagtgaaacctctactcaacgatgtttccggcggaggcttgcgacgga 300
G K P A S V K P L L N D V S G E A C D G
gacatcctagccggttctcggagcaagcggagccggaaagtccacgttgatcgacgcgcta 360
D I L A V L G A S G A G K S T L I D A L
gccccgacgagtggttagcttgagaggcacggtaactctaaacggagagaagatcttgcaa 420
A G R V G S L R G T V T L N G E K I L Q
actcgtttgctgaaagtgatatcagcttacgtcatgcaagacgatctttgttcccgatg 480
T R L L K V I S A Y V M Q D D L L F P M
ctcaccgtcaaagaaactctaattgtcgttcagagtttcgtctcccgagaagcttgcc 540
L T V K E T L M F A S E F R L P R S L S
aagtccaagaaaatggagcgtgttcaaacctaatagaccagttagggtcagagacgcc 600
K S K K M E R V Q T L I D Q L G L R D A
gccccgataataggagacgaaggtcaccgtggagctcgggtggagagcggcggcgc 660
A D T I I G D E G H R G V S G G E R R R
gtgtcgataggaatcgatatcatccacgaccctatcctctgttcttgatgaacctacg 720
V S I G I D I I H D P I L L F L D E P T
tccccggttgattcaaccaacgcgtttatggtggtgcaggttctaaacgtatagctagg 780
S G L D S T N A F M V V Q V L K R I A R
agtggtagtatcgtaattatgacaatacatcaacctagcggtcgagttcttgacttgctt 840
S G S I V I M T I H Q P S G R V L D L L
gatcgtcttatcatcttatctcgcggcgagaatgtttcagcggttctccgacaagtctt 900
D R L I I L S R G E N V F S G S P T S L
cctcagttctgtctgatttcggacatcctatccccggagaaagagaacataaccgagttc 960
P Q F L S D F G H P I P E K E N I T E F
gcacttgacctagttcggcagctcgaaggagctggtgaaggaaccagagagttagttgag 1020
A L D L V R Q L E G A G E G T R E L V E
ttcaacgagaagtggaacagaaccaatccgctcgagccacgccaatgaccacaccttac 1080
F N E K W Q Q N Q S A R A T P M T T P Y
caagccttgtctctaaaagaatccattaccgcaagtgtttcgagaggcaagctagtctcc 1140
Q A L S L K E S I T A S V S R G K L V S
ggttcaaccagttccgatccaattccatggactcagtatcttcatacgcgaaacccgcca 1200
G S T S S D P I S M D S V S S Y A N P P
ctggtcgagacctttatcttagccaaacgggtacatgaaaaactggatccggacacccgag 1260
L V E T F I L A K R Y M K N W I R T P E
ctcatagggacaaggatcgccaactgtcatgggtgactggcttctcttagctactatatac 1320
L I G T R I A T V M V T G L L L A T I Y
tgagggttgacaacactccaagaggtgcacaagagcggatggcttctttgcatttggc 1380
W R L D N T P R G A Q E R M A F F A F G
atgtccacaatgttctacgtctgtcgggacaacgttctgttttctcaaagaacgggtc 1440
M S T M F Y V C A D N V P V F L K E R F

```

atcttctgagagaggtcaacgcgcaacgcatacagaatatcttcgtatgtcatctctcac 1500
I F L R E S T R N A Y R I S S Y V I S H
tctctgtctctctgcctcagctactcgctctctccatcgcatcttgctgcgaccacgctc 1560
S L V S L P Q L L A L S I A F A A T T F
tggactgttggttgagcgggtggactagagagctttctctattactgcctcataatctac 1620
W T V G L S G G L E S F L Y Y C L I I Y
gcagggttttggtccggatcctctttgtcacccttggtccggttggtccgaatgtc 1680
A G F W S G S S F V T F V S G L V P N V
atgataagttcatgatcactattgcctatcttctactgtctactcttgggtggattc 1740
M I S F M I T I A Y L S Y C L L L G G F
tacattaaccgggatcggataaccggttactggatattgggttcattacattcattgttg 1800
Y I N R D R I P V Y W I W F H Y I S L L
aagatccctacgaagctgtcttgatcaacgagttgatgacccatctcgttgtttgtt 1860
K Y P Y E A V L I N E F D D P S R C F V
agaggagtccaagtgttgatggaacgcctttggcgaaagtgcctgatgcatgaaggtt 1920
R G V Q V F D G T L L A K V P D A M K V
aagctcctcgatacactgagtagctctttaggaacaacgataacggagtcacatgcttg 1980
K L L D T L S S S L G T T I T E S T C L
agaacagggcctgacttactttgcaacaaggtatttctcagttgagcaaatgggattgc 2040
R T G P D L L L Q Q G I S Q L S K W D C
ttgtggattacgttagcttgggtctctctttaggatcttatttacttctctttgctg 2100
L W I T L A W G L F F R I L F Y F S L L
tttgaagcaagaataagaggacg 2124
F G S K N K R T

```

Figure 2-23. Nucleotide sequences and its deduced amino acid sequences of ABC transporter proteins in *B. rapa*.

2) ABC(ATP-binding cassette) 수송체의 아미노산 배열 상동성 비교 및 계통 분석

Cloning된 4종의 ABC transporter 유전자를 Arabidopsis, 벼, 옥수수 유래의 ABC transporter 유전자와 비교하여 계통수를 작성하였다(Fig. 2-24). 그 결과, no. 272 유전자는 ABC 유전자 subfamily C군에 속하는 벼의 OsMdr14, 옥수수의 ZmPgp1 및 Arabidopsis의 AtPgp1과 같이 grouping되었다. No. 14 및 no. 289 유전자는 subfamily G군에 속하는 Arabidopsis의 AtAbcg 및 AtAbcg2와 같이 grouping되었다. No. 261 유전자는 subfamily F군에 속하는 Arabidopsis의 AtAbcf2 및 AtAbcf3와 같이 grouping되었다.

3) ABC의 Southern blot 및 RT-PCR 분석

배추 게놈내 ABC transporter 유전자의 다양성을 분석하기 위하여 cloning된 4종 유전자를 probe로 이용하여 Southern blot 분석을 하였다(Fig. 2-25). 3종의 제한효소로 소화한 결과 각 유전자는 다양한 양상으로 나타났다.

Cloning된 4종 유전자의 기관 발현성을 검토하기 위하여 주두, 수술, 꽃잎, 악편, 화경, 엽, 줄기 및 뿌리의 total RNA를 이용하여 RT-PCR분석을 하였다. 그 결과, 모든 기관에서 유전자 산물이 강하게 발현되었다(Fig. 4).

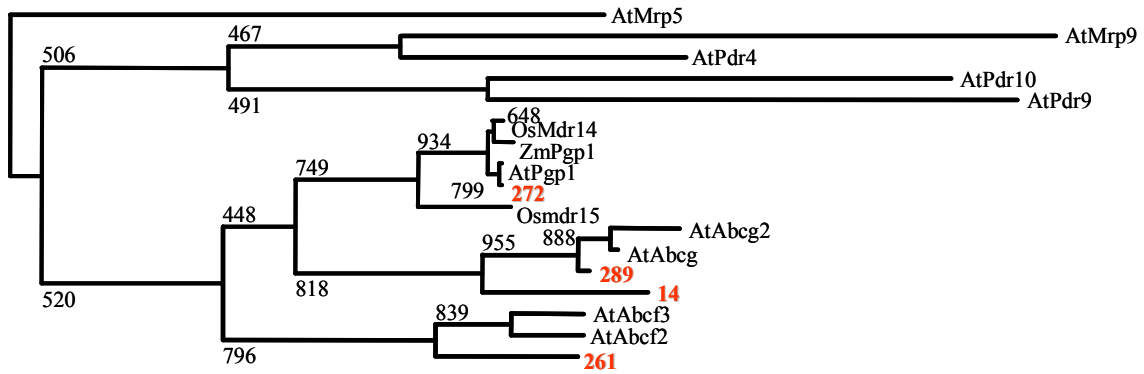


Figure 2-24. Phylogenetic tree of ABC transporter proteins. Representative members of the ABC transporter superfamily from *Arabidopsis thaliana* L. (AtMrp 5, AtMrp 9, AtPdr 4, AtPdr 9, AtPdr 10, AtPgp 1, AtAbcg 2, AtAbcf 3, AtAbcf 2), *Zea mays* L. (ZmPgp 1) and *Oryza sativa* L. (OsMdr 14, OsMdr 15). Red bolds (14, 261, 272 and 289) were isolated from *Brassica rapa* in this study.

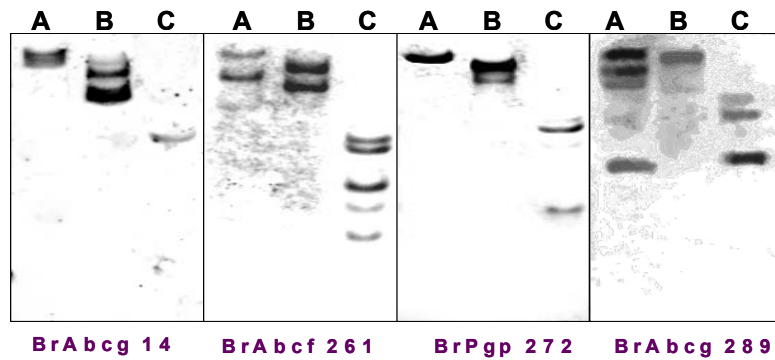


Figure 2-25. Southern blot analyses of ABC transporter proteins (No. 14, No. 261, No. 272 and No. 289) in *Brassica rapa*. Chinese cabbage genomic DNA was digested with *Bam*HI(A), *Eco*R I(B), *Hind*III(C) enzymes.

4) ABC의 plasmolysis

이들 유전자가 세포벽 혹은 세포막에 존재하는지를 분석하기 위하여 plasmolysis 실험을 하였다. 그 결과, no. 272 유전자는 녹색의 형광색소가 세포막에 강하게 나타났다. 반면 세포벽 주변에는 강한 시그널이 보이지 않았다(Fig. 2-27).

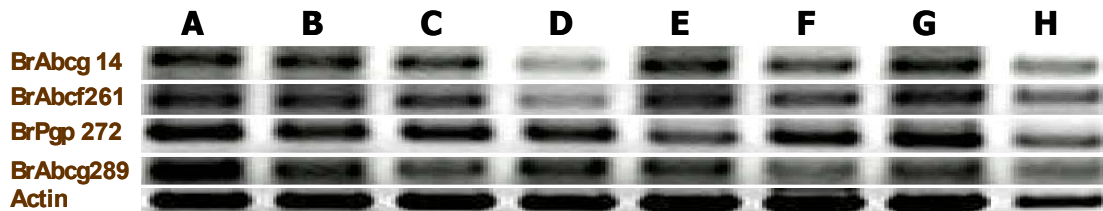


Figure 2-26. Expression of Chinese cabbage ABC transporter genes in *Brassica rapa* tissue. Semi-quantitative RT-PCR was performed on total RNA of the various tissues using gene-specific primers. The constitutively expressed actin gene was used as an internal control of RNA quantity. Lane A; Stigma, Lane B; Stamen, Lane C; Petal, Lane D; Calyx, Lane E; Flower stalk, Lane F; Mature leaf, Lane G; Stem, Lane H; Root.

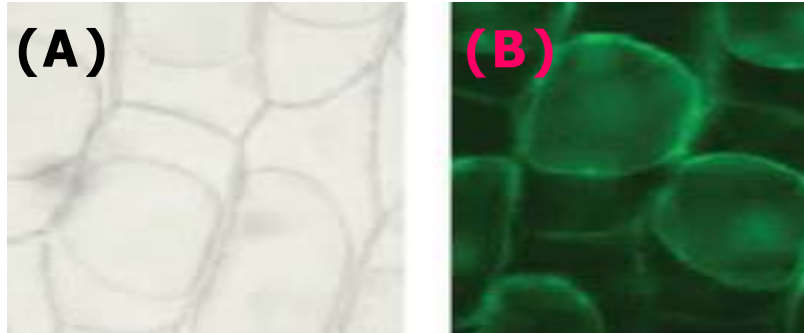


Figure 2-27. Subcellular localization of EGFP fusion protein in onion epidermal cells. (A); Cell structure under light microscopy. (B); Green fluorescence signal of EGFP-no. 272 after plasmolysis with 20% (w/v) sucrose for 5 min. Plasma membrane and GFP signal shrank together from cell wall.

4. 배추의 완전장 cDNA library로부터 Bromelain 유전자 분리 및 형질전환

가. 서론

파인애플줄기(*Ananas comosus*)에서 얻어지는 bromelain은 단백질 분해효소 중 cystein protease 로 분류되는 protease의 복합체로 파인애플에 고농도로 존재함이 밝혀져 있다. 파인애플은 중세 시대부터 세계 여러 곳에서 민간약용물질로서 사용이 되어왔으며, 파인애플로부터 추출되어진 bromelain은 보조소화제, 소염제(Mynott et al., 2002 ; Manhart et al., 2002 ; Gaspani et al., 2002 ; Maurer 2001), 항 혈청 응고제, 항암작용, cytokines 조절 및 면역작용, 피부 좌멸조직 제거, 순환계 활성화 증강 등의 의약품으로써 효과가 있는 것으로 보고되어져있다.(Engwerda et al., 2001), Bromelain은 보통 얻어진 기원으로부터 과일 bromelain과 줄기 bromelain으로 대별 되는데, 현재 줄기로부터 얻어진 bromelain이 의약품으로 널리 이용되어지고 있다. 또한 bromelain은 단백질 분해 효소 외에 peroxidase, acid phosphatase, protease inhibitor 등 여러 물질이 함유되어 있기 때문에 단백질 분해능은 동일해도 그 유래에 따라 서로 다른 효과를 보이는 것으로 보고되었다 (Manhart et al., 2002 ; Gaspani et al., 2002). Khan 등 (Khan et al., 2003)은 이들 효과를 단백질 합성과정이나 저장과정에서 glycosylation의 정도에 따라 활성의 변화를 보인다고 하였다. 일반적으로 bromelain 은 안정성이 매우 높아 부작용이나 독성이 없고 가장 중요한 특징 중 하나는 계속 사용하여도 신체 내에 내성이 생기지 않으며, 섭취량의 40% 정도가 전혀 변화되지 않은 채로 흡수되고, 주로 섭취 후 1시간 후에 혈액에서 가장 많이 발견이 된다. 또 다른 특징 중 하나는 이 물질은 351개의 amino acid로 구성되어 있는 단백질이므로 다른 단백질과 같이 대사가 되어 분해가 되는 물질로 인체에 해가 없으나 열에는 안정되지 않는 것으로 알려져 있다(Mynott et al., 2002). 본 연구에서는 배추의 완전장 cDNA library로부터 Bromelain 유전자 분리하여 유전자의 기능을 분석하기위하여 배추에 형질전환체를 육성하여 그 특성을 살펴보았다.

나. 재료 및 방법

1) Bromelain 유전자 cloning

배추의 완전장 cDNA library로부터 Guanidine법(Chirgwin 등 1979)에 의하여 total RNA

를 추출한 후 oligo(dT)-칼럼에 의해 poly(A+) RNA를 조제하였다. Bromelain 유전자를 증폭하기 위해서 NCBI에 등록된 bromelain 유전자 염기서열 분석결과를 기초로 sense primer: 5'-ATGGCTTCCAAAGTTCAACTCG-3' 및 antisense primer 5'-TCAAGTTTGTAGAAACCATCTT-3'를 합성하였다. RT-PCR의 반응조건은 95°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension 과정을 35cycle로 실시하였고, 1.5% 아가로스 겔 상에서 증폭된 밴드를 확인하였다. 증폭산물을 T-Easy Vector(Promega, USA)에 cloning 하여 염기배열을 결정하였다. 또한 형질전환의 recipient인 'Osome'로부터 bromelain 유전자의 염기서열을 분석하기 위해 저자 등이 작제한 'Osome'의 잎, 뿌리, 줄기 및 화아기관의 종합적 full-length library를 이용하여 상기의 primers에 의해 bromelain 유전자를 cloning하였다.

2) 식물 발현벡터의 구축

GUS유전자를 포함하고 있는 pBI121을 BamH I 과 Sac I 처리에 의해 GUS 유전자를 제거한 후, 그 위치에 bromelain 유전자를 삽입시켰다. 재조합체를 E. coli(XLI-blue)에 형질전환시킨 후, kanamycin 50mg/L을 포함한 LB배지에서 선발된 단일 colony로부터 plasmid를 추출하여 insert DNA의 유무를 확인하였다. 확인된 plasmid는 액체질소를 이용하여 freeze-thaw method(An et al. 1988)에 의해 Agrobacterium tumefaciens LBA 4404와 EHA 101에 형질전환시켰다. 공시 균주의 배양은 50mg/L kanamycin이 첨가된 LB 액체배지에 접종한 후, 2~3일 동안 28°C에서 배양하였다.

3) 'Osome' 형질전환체의 작성

과중 후 무균 상태로 6일간 자란 배축을 0.7cm 정도로 자른 뒤 NAA 0.5mg/L, BA 0.1mg/L을 포함한 MS 고체배지에서 1일간 pre-culture하였다. Pre-culture가 끝난 배축을 Agrobacterium tumefaciens (LBA4404, EHA101)을 pre-culture의 hormone 조성과 동일한 MS 액체배지에 희석(107 cell/ml)한 후 30분간 침적하여 감염시켰다. 감염된 배축을 멸균된 filter paper로 여분의 액을 제거하였고, 상기와 동일한 hormone 조성의 MS고체배지 위에 멸균된 filter paper를 한 장 깔고 그 위에 배축을 치상 하여 2일간 28°C에서 암 상태로 공배양하였다. 공배양에 의해 감염된 배축 절편의 Agrobacterium tumefaciens을 제거하기 위하여 500mg/L의 carbenicillin이 포함된 멸균수에 배축 절편을 3회 세척한 후 담배의 feeder cell을 포함한 callus 유도배지(NAA 0.5mg/L, BA 0.1mg/L, kanamycin 100mg/L, carbenicillin 500mg/L)에 치상하여 25°C에서 16/8hr의 일장으로 14일간 배양하였다. 그 후 재분화 배지(NAA 0.5mg/L, BA 0.1mg/L, kanamycin 10-50mg/L, carbenicillin 500mg/L)에서 14일 간격으로 3회 계대배양하였으며, 재분화된 shoot는 성숙배지(NAA 0.5mg/L, BA 0.1mg/L, kanamycin 100mg/L, carbenicillin 500mg/L)에서 3주간 성숙시킨 후, kanamycin 100mg/L이 포함된 MS hormone free 배지에 이식하여 발근을 유도하였으며, 발근된 식물체는 포트에 이식하여 순화시켰다.

4) 형질전환체의 검정

재분화 된 식물체에서 bromelain 유전자의 도입여부를 확인하기 위하여 잎으로부터 SDS 법에 의해 gDNA를 추출하였다. 형질전환체를 확인하기 위하여 35S promoter 특이적 sense primer(5'-TTCAACAAAGGGTAATATCCGG-3')와 antisense primer(5'-CGAAGGATAGTGGGATTGTGC-3'), NPTII 특이적 sense primer(5'-GAGGCTATTCCGGCTAGACT G-3')와 antisense primer(5'-ATCGGGAGCGGCGATACCGT A-3') 및 bromelain 유전자 특이적 sense primer (5'-ATGGCTTCCAAAGTTCAACTCG TG- 3')와

antisense primer(5'- TCAAGTTTCAGAAACCATCTT-3')를 이용하여 PCR반응을 하였다. PCR반응은 94°C 에서 1분간 denaturation, 60°C 에서 1분간 annealing, 72°C 에서 2분간 extension 과정을 35 cycle 실시하였다. PCR산물은 1% agarose gel에 전기영동 후, UV상에서 유전자 증폭산물을 확인하여 형질전환의 여부를 판단하였다.

5) T1 및 T2 형질전환 'Osome' 의 육성 및 transgenic events 선발

순화시킨 형질전환체를 5°C에서 45일간 저온처리 후 개화시켜 자식종자(T1)를 획득하였다. T1 종자는 항생제 내성실험을 위하여 25립을 Hyg 50mg/L이 포함된 1/10 MS배지에 치상하였다. 치상 10일 후 고사유무를 판정하여 형질전환체임을 확인한 후, 배지로부터 pot로 옮겨 분엽 5-6매 정도까지 성장시킨 후 위와 같이 저온처리 후 자식종자(T2)를 획득하였다. 또한, T2 종자의 약제내성 검정을 위하여 T1 세대 18 계통의 T2종자를 계통당 15-20립씩 Hyg 50mg/L이 포함된 1/10 MS배지에 치상하였다. 치상 10일 후 지속적 성장여부를 판정하여 transgenic events(이하 homo line이라 칭함)를 선발하였다. 선발된 homo line은 배지로부터 pot로 옮겨 분엽 5-6매 정도까지 성장시킨 후 저온처리 후 자식종자(T3)를 획득하였다.

6) RT-PCR 및 Real-time PCR에 의한 bromelain 유전자 발현 검정

Transgenic events의 bromelain 유전자 발현정도를 분석하기 위해 엽조직(0.2g)에서 mRNA를 추출 (Novagen, Inc., Madison, Wis. USA)하였다. RT-PCR을 위하여 mRNA를 reverse transcriptase(Promega, USA)를 cDNA로 전환하였고, NPTII primer(sense 5'-GAGGCTATTCGGCTAGACTG-3', antisense 5'-ATCGGGAGCGGCGATACCGTA-3'), bromelain 특이적 primer(sense 5'-TTTCAATATTACAATGGCGGTG-3', antisense 5'-CTGGATTGTAGAGTGAGGATAGCA-3') 및 β -actin primer(sense 5'-GCGAGGGCATGACTCGTAAA- 3', antisense 5'-GCGACTGGAA GATGTTGCGTGT-3')를 이용하여 94°C 에서 1분간 denaturation, 58°C 에서 1분간 annealing, 72°C 에서 1분간 extension 과정을 30 cycle 실시하였다. Real-time PCR은 SmartCycler II (Cepheid, USA)를 사용하였고, target gene인 bromelain 특이적 primer(sense 5'-GGCAGGATAGCAGTGGAAACAATA- 3', antisense 5'-AGAGTGGGATAGAGAGGATCCATGGC-3')와 reference gene인 actin 특이적인 primer(sense 5'-TCCTCAGTGGTGGTTCGACCAT-3', antisense 5'-GCGACCACCTT GATCTTCATGCT-3')를 이용하였다. PCR반응은 95°C에서 10초간 denaturation, 60°C에서 30초간, 45 cycle 실시하였으며, melting curve 작성은 0.2°C/초의 속도로 증가시키면서 형광값을 측정하였다.

7) Real-time PCR의 target gene과 reference gene의 정량

Standard curve 범위 내에서 sample의 target gene과 reference gene의 발현을 정량하였다. 각 sample의 cDNA stock (5ng/ μ l)을 50배 희석하여 tube 당 5 μ l를 넣었다. 정량 PCR에는 SmartCycler II (TaKaRa, Japan)와 SYBR RT-PCR kit (Perfect Real Time)을 이용하였으며, 증폭된 DNA와 결합한 SYBR Green I을 검출하는 방법을 사용하였다. 검출된 Ct 값으로부터 standard curve를 이용하여 상대 발현량을 계산하였으며, 각 sample에 대해 2반복으로 측정하였고 평균값을 분석에 이용하였다. 또한, 각 sample의 reference gene의 발현량을 1로 보정하였고, 그 값에 대한 target gene의 발현량을 계산하였다. 계산된 값은 graph로 표시하였다.

8) 무름병균 접종 및 발병율

상처 접종을 위하여 *Brassica rapa* "Osome"를 50공 tray에 파종하여 유리온실에서 3주간 재배하였으며, 본엽 4 - 5매 시에 Ren 등(2001) 등의 방법에 의해 바늘 침지법으로 무름병균을 제 3 본엽의 엽병에 접종하였다. 접종된 식물체는 23℃의 mist-chamber에서 100%의 습도를 유지하였다. 또한 무상처 접종은 1개월 된 유묘를 포장에 45cm x 90cm 간격으로 이식하였다. 이식 2주일 후, Ren 등(2001)의 방법에 따라 침봉으로 상처를 낸 부위에 무름병균이 포말 된 agar slurry를 접종하였다. 접종 후 식물체를 비닐 피복한 후, 1일 3회 관수함으로써 고습도를 유지시켰다. 접종세균의 농도는 상처 및 무상처 공히 2.1*10² CFU/mL이었으며, 접종 10일 후에 무름병균의 발병율을 조사하였다. 발병엽율(%)은 무름병에 감염된 식물체엽/개체당 식물체 전엽×100으로 계산하였으며, 한 처리구당 3반복 조사하였다.

다. 결과 및 고찰

1) RT-PCR법에 의한 bromelain 유전자 cloning 및 binary vector 구축

RT-PCR법을 이용하여 배추 "Osome" 유래 mRNA로부터를 cloning하여 염기서열을 분석하였다. bromelain 유전자는 전장이 1,050bp 이었다. 또한 유사한 유전자가 파인애플에 존재하는지를 확인하기 위하여 동일한 방법으로 PCR cloning을 한 결과, 1,056bp bromelain-like 유전자를 cloning하였다. 2개의 유전자간에는 3' 말단에 상이성이 나났으며(Fig. 2-28), 염기 수준에서 99%, 아미노산 수준에서 96%의 상동성을 보였다(Fig. 2-29). 또한 GenBank에 등록된 bromelain 유전자들과의 상동성을 분석한 결과, 파인애플 간에는 78-96%, 배추와 파인애플 간에는 73-93%의 높은 상동성을 보였다.

식물 발현 binary vector 구축을 위하여 pBI121의 GUS유전자를 BamH I 과 Sac I 처리에 의해 제거한 후, 그 위치에 cloning한 배추 "Osome"의 bromelain 유전자를 삽입시켰다(Fig. 2-30).

| | |
|----------|--|
| Ananas | ATGGCTTCCAAAGTTCAACTCGTGTTCCTTTCTTGTTCCTCTGTGCGATGTGGGCTTCG 60 |
| Brassica | ATGGCTTCCAAAGTTCAACTCGTGTTCCTTTCTTGTTCCTCTGTGCGATGTGGGCTTCG 60 |
| | ***** |
| Ananas | CCATCGGCAGCTTCTCGTGACGAACCCAATGATCCCATGATGAAGCGGTTTGAAGAATGG 120 |
| Brassica | CCATCGGCAGCTTCTCGTGACGAACCCAATGATCCCATGATGAAGCGGTTTGAAGAATGG 120 |
| | ***** |
| Ananas | ATGGCAGAGTACGGCCGAGTGTACAAGGACAACGACGAGAAGATGCGCCGGTTTCAGATA 180 |
| Brassica | ATGGCAGAGTACGGCCGAGTGTACAAGGACAACGACGAGAAGATGCGCCGGTTTCAGATA 180 |
| | ***** |
| Ananas | TTCAAGAACAACGTGAACCATATCGAAACCTTTAACAGTCGCAACGGAAATTCGTACACT 240 |
| Brassica | TTCAAGAACAACGTGAACCATATCGAAACCTTTAACAGTCGCAACGGAAATTCGTACACT 240 |
| | ***** |
| Ananas | CTCGGTATCAATCAGTTTACCGATATGACAAAAAGCGAATTTGTTGCTCAATATACCGGC 300 |
| Brassica | CTCGGTATCAATCAGTTTACCGATATGACAAAAAGCGAATTTGTTGCTCAATATACCGGC 300 |
| | ***** |
| Ananas | GTATCTCTCCCACTAAATATCGAGAGAGAGCCAGTGGTGTGTCATTTGATGACGTAAACATC 360 |
| Brassica | GTATCTCTCCCACTAAATATCGAGAGAGAGCCAGTGGTGTGTCATTTGATGACGTAAACATC 360 |
| | ***** |
| Ananas | TCCGCAAGTGCCTCAAAGTATTGATTGGAGAGACTATGGTGCCTAAACGAGGTCAAGAAT 420 |
| Brassica | TCCGCAAGTGCCTCAAAGTATTGATTGGAGAGACTATGGTGCCTAAACGAGGTCAAGAAT 420 |
| | ***** |
| Ananas | CAAAACCCCTGTGGTTCTTGCTGGTCATTGCTGCAATTGCGACGGTGGAGGGAATCTAC 480 |
| Brassica | CAAAACCCCTGTGGTTCTTGCTGGTCATTGCTGCAATTGCGACGGTGGAGGGAATCTAC 480 |
| | ***** |
| Ananas | AAGATCAAACAGGGTATTTAGTATCTTTATCGGAGCAAGAAGTTCTCGATTGTGCTGTT 540 |
| Brassica | AAGATCAAACAGGGTATTTAGTATCTTTATCGGAGCAAGAAGTTCTCGATTGTGCTGTT 540 |


```

*****
Ananas      AGCTACGGGTGCAAAGGCGGCTGGGTGAACAAGGCCTACGATTCATCATATCTAACAAC 600
Brassica    AGCTACGGGTGCAAAGGCGGCTGGGTGAACAAGGCCTACGATTCATCATATCTAACAAC 600
*****
Ananas      GGTGTGACCACCGAAGAAAACATCCTTATCAAGCATACCAAGGCACTTGCAACGCCAAT 660
Brassica    GGTGTGACCACCGAAGAAAACATCCTTATCAAGCATACCAAGGCACTTGCAACGCCAAT 660
*****
Ananas      AGCTTTCCTAATTCAGCTTACATTACTGGTATTTCATATGTGCGAAGGAACGACGAACGC 720
Brassica    AGCTTTCCTAATTCAGCTTACATTACTGGTATTTCATATGTGCGAAGGAACGACGAACGC 720
*****
Ananas      AGTATGATGTACGCTGTGTGCGAATCAACCAATAGCTGCTCTTATCGATGCCAGTGAAAAC 780
Brassica    AGTATGATGTACGCTGTGTGCGAATCAACCAATAGCTGCTCTTATCGATGCCAGTGAAAAC 780
*****
Ananas      TTTC AATATTACAATGGCGGTGTGTTTAGTGGACCCTGTGGAAGTCTCAATCATGCC 840
Brassica    TTTC AATATTACAATGGCGGTGTGTTTAGTGGACCCTGTGGAAGTCTCAATCATGCC 840
*****
Ananas      ATCACCATTATAGGTTACGGGCAGGATAGCAGTGGAAACACAATATTGGATTGTAAGAAG 900
Brassica    ATCACCATTATAGGTTACGGGCAGGATAGCAGTGGAAACACAATATTGGATTGTAAGAAG 900
*****
Ananas      TCATGGGGTAGCTCATGGGGTGAACGTGGATACATCCGTATGGCGAGAGGTGTGTCTTCG 960
Brassica    TCATGGGGTAGCTCATGGGGTGAACGTGGATACATCCGTATGGCGAGAGGTGTGTCTTCG 960
*****
Ananas      TCTGGATTATGTGGAATCGC-CATGGATC-CTCT-CTATCC-CACTCTACAATCAGGGGC 1016
Brassica    TCTGGATTATGTGGAATCACACGTGGATCACTCTGCTATCCTCACTCTACAATCCAGGGGC 1020
*****
Ananas      --TAATGTGCGCAGTTATTAAGATGGTTTCTAAAACCTTGA 1053
Brassica    GCTAATGTAGCAGTACTAAGATGGTTTCTAAAACCTTGA 1059
*****

```

Figure 2–28. Sequence comparison between bromelain from pineapple and Chinese cabbage.

```

Brassica    MASKVQLVFLFLFLCAMWASPSAASRDEPNPMMKRFEEWMAEYGRVYKDNDEKMRRFQI 60
Ananas      MASKVQLVFLFLFLCAMWASPSAASRDEPNPMMKRFEEWMAEYGRVYKDNDEKMRRFQI 60
*****
Brassica    FKNNVNHIETFNSRNGNSYTLGINQFTDMTKSEFVAQYTGVSPLNIEREPVWSFDDVNI 120
Ananas      FKNNVNHIETFNSRNGNSYTLGINQFTDMTKSEFVAQYTGVSPLNIEREPVWSFDDVNI 120
*****
Brassica    SAVPQSIDWRDYGAVNEVKQNQPCGSCWSFAAIATVEGIYKIKTGVLVSLSEQEVLDCAV 180
Ananas      SAVPQSIDWRDYGAVNEVKQNQPCGSCWSFAAIATVEGIYKIKTGVLVSLSEQEVLDCAV 180
*****
Brassica    SYGCKGGWVNKAYDFIISNNGVTTEENYPYQAYQGTCNANSFPNSAYITGYSYVRRNDER 240
Ananas      SYGCKGGWVNKAYDFIISNNGVTTEENYPYQAYQGTCNANSFPNSAYITGYSYVRRNDER 240
*****
Brassica    SMMYAVSNQPIAALIDASENFQYYNGGVFSGPCGTSLNHAIITIGYGDSSGTQYWIVKN 300
Ananas      SMMYAVSNQPIAALIDASENFQYYNGGVFSGPCGTSLNHAIITIGYGDSSGTQYWIVKN 300
*****
Brassica    SWGSSWGERGYIRMARGVSSSGLCGITRGLCYPHSTIQGANVAVTKMVSKT 352
Ananas      SWGSSWGERGYIRMARGVSSSGLCGIAMDPLYP--TLQSGANVAVIKMVSKT 350
*****

```

Figure 2–29. Alignment of the amino acid sequences of bromelain from pineapple and Chinese cabbage.

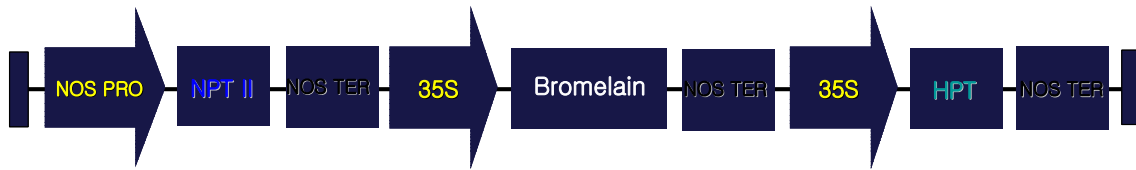


Figure 2-30. Gene map of pBI121 binary vector. Bromelain gene was replaced to GUS site.

2) bromelain 유전자를 도입한 형질전환 서울배추의 작성

bromelain 유전자를 삽입한 식물발현 벡터를 배축법(Takasaki 등, 1997; Kuginuki 등, 2001)에 의하여 서울배추에 도입하였다. *Agrobacterium*을 감염시킨 절편체를 callus 유도배지에서 배양 10일 후부터 callus가 형성되기 시작하였다(Fig. 2-31. A). 또한 재분화 배지에 2회째의 계대배양 후기부터 callus에서 부정아가 형성되기 시작하였으며 3회 계대배양에서는 많은 multi-shoot가 발생하였다(Fig. 2-31. B). 이들 작은 싹들은 성숙배지에서 초장이 7-8cm 정도 될 때까지 성장시킨 후, kanamycin 100mg/L이 포함된 MS hormone free 배지로 옮겨 발근을 유도하였다(Fig. 2-31. C). 발근된 개체는 pot에 옮겨 순화시켰으며, 8-10°C, 40일간 저온처리 후, 개화를 유도하였다. 개화된 개체는 bud-pollination에 selfing seed(T1)을 획득하였다(Fig. 2-31. D).

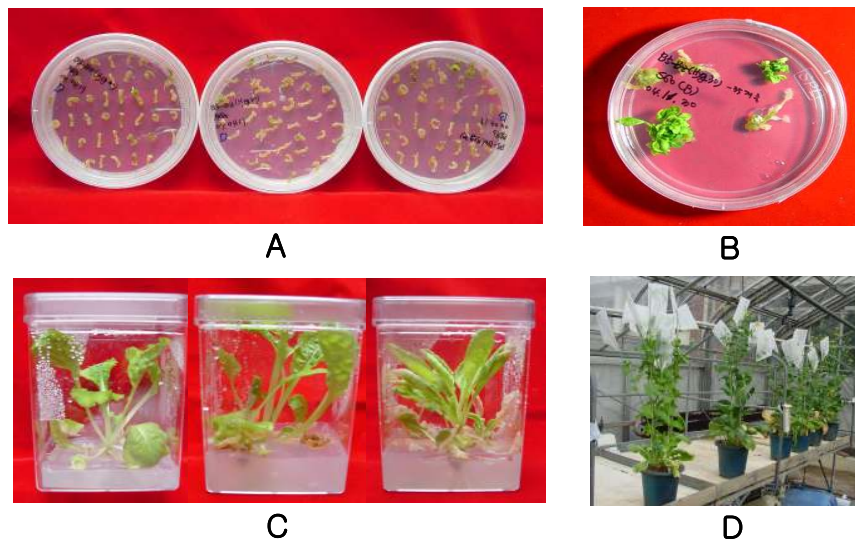


Figure 2-31. 'Osome' plants transformed with pBI121 vector including bromelain gene. A, Callus formation. B, Multi-shoot differentiation. C, Regenerated plants in rooting medium. Initial selection of regenerated explants by culturing on a kanamycin and carbenicillin containing MS medium, multiple shoots were obtained after 2 months of culture. For a complementary step of selection, putative transgenic shoots were transferred to 1/2 MS basal medium supplemented with 100mg/L kanamycin and 500mg/L carbenicillin. D, Obtaining of selfing seed(T1) after vernalization.

3) 약제내성에 의한 T1 형질전환체 선발 및 T2 종자 획득

항생제 내성실험을 위하여 너수분에 의해 획득한 T1 25개체의 자식종자를 Hyg 50mg/L 이 포함된 1/10 MS배지에 멸균하여 치상하였다. 치상 10일 후, 발아, 생육 및 고사 정도를 판정하여 18개체(72%)가 형질전환체임을 확인하였다. 이들 18개체(이하 계통이라 함)들을 배지로부터 pot로 옮겨 본엽 5-6매 정도까지 성장시킨 후, 위와 같이 저온처리 후 자식종자 (T2)를 획득하였다.

4) 약제내성에 의한 T2 transgenic events 계통 선발

T1 18 계통의 자식종자(T2)를 계통 당 15-20립을 Hyg 50mg/L이 포함된 1/10 MS배지에 치상하였다. 치상 5일 후 지속적 성장여부에 관한 계통 내 분리유무를 판정하여 생사를 결정하였으며, 그 결과를 Table 1에 나타냈다. 18계통 중 6계통(6-1, 6-2, 6-3, 6-9, 6-10, 6-22)은 non-transformants, 7계통(6-5, 6-6, 6-7, 6-13, 6-18, 6-19)은 도입된 유전자가 heterozygotes, 5계통(6-4, 6-8, 6-12, 6-17, 6-20)은 도입된 유전자가 transgenic events이었다(Fig. 2-32).

Table 2-19. Results of hygromycin selection for bromelain gene transformed T2 generation in *B. rapa* 'Osome'

| Acc No. | Strain No. | Sowing No. | 5 day after sowing | | Survive ratio(%) | NT/He/Ho of strains |
|---------|------------|------------|--------------------|-------|------------------|---------------------|
| | | | Survive | Death | | |
| 1 | 6-1 | 20 | 0 | 20 | 0 | N.T |
| 2 | 6-2 | 20 | 0 | 20 | 0 | N.T |
| 3 | 6-3 | 19 | 0 | 19 | 0 | N.T |
| 4 | 6-4 | 19 | 19 | 0 | 100 | T.E |
| 5 | 6-5 | 19 | 13 | 6 | 68.4 | He |
| 6 | 6-6 | 20 | 11 | 9 | 55.0 | He |
| 7 | 6-8 | 16 | 16 | 0 | 100 | T.E |
| 8 | 6-9 | 18 | 0 | 18 | 0 | N.T |
| 9 | 6-10 | 20 | 0 | 20 | 0 | N.T |
| 10 | 6-12 | 20 | 20 | 0 | 100 | T.E |
| 11 | 6-13 | 19 | 7 | 12 | 36.8 | He |
| 12 | 6-17 | 15 | 15 | 0 | 100 | T.E |
| 13 | 6-18 | 20 | 17 | 3 | 85.0 | He |
| 14 | 6-19 | 19 | 12 | 7 | 63.2 | He |
| 15 | 6-20 | 20 | 20 | 0 | 100 | T.E |
| 16 | 6-21 | 20 | 8 | 12 | 40.0 | He |
| 17 | 6-22 | 19 | 0 | 19 | 0 | N.T |
| 18 | 6-23 | 19 | 11 | 8 | 57.9 | He |

N.T: none transformants; He: Heterozygotes; T.E: Transgenic events.

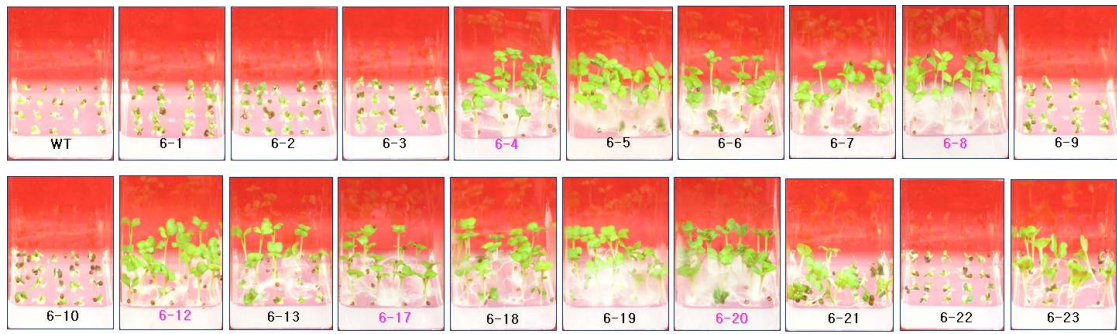


Figure 2-32. Antibiotic(Hyg 50mg/L) tolerant test in T2 generation(WT: Wild type, Transgenic events: 6-4, 6-8, 6-12, 6-17, 6-20, Heterozygotes: 6-5, 6-6, 6-7, 6-13, 6-18, 6-19, 6-21, 6-23, Non transformants: 6-1, 6-2, 6-3, 6-9, 6-10,6-22).

5) Transgenic events의 형질전환 확인 및 bromelain 유전자의 발현

도입유전자가 호모상태인 형질전환체임을 확인하기 위하여 6-8, 6-17 및 6-20으로부터 각 3개체의 total DNA를 template로 35S promoter primer, 35S와 bromelain primer 조합 및 NPTII primer를 이용하여 PCR반응을 실시하였다. 그 결과, 유전자를 도입하지 않은 비형질전환체에서는 PCR 산물이 검출되지 않았으나 Transgenic events에서는 목적 size의 DNA 단편이 명확히 검출되었다(Fig. 2-33. A, B, C).

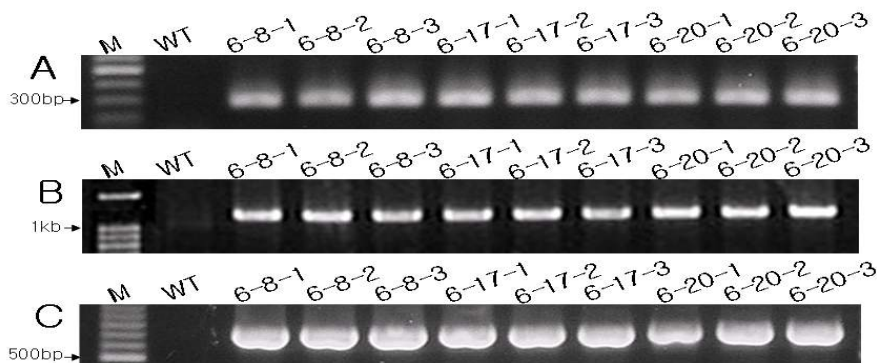


Figure 2-33. PCR analysis of selected T2 transgenic events. Lane M: 100bp DNA ladder, Lane WT: wild type, Lanes 6-8-1~6-20-3: 3 different transgenic lines(A: 35S promoter primer, B: 35S and cysteine proteinase specific primers, C: NPTII primer).

또한 NPTII 유전자와 도입시킨 bromelain 유전자의 발현 여부를 확인하기 위하여 6-4, 6-8, 6-12, 6-17 및 6-20의 mRNA를 이용하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과, β -actin primer에서는 wild type plants를 포함한 모든 transgenic events에서 균일한 발현정도의 산

물이 증폭되었으며(Fig. 6. C), NPTII 및 bromelain 유전자 특이적 primer에서는 목적크기의 발현 산물이 증폭되었다(Fig. 2-34. A, B).

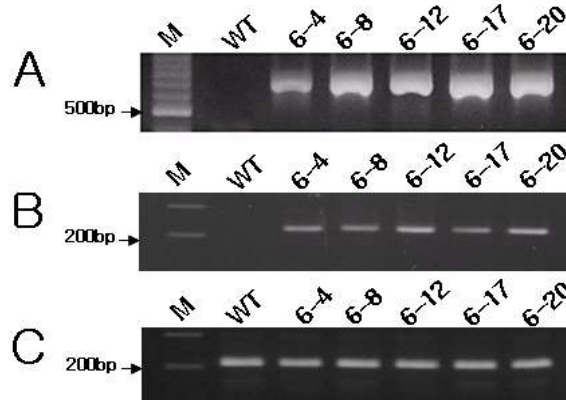


Figure 2-34. RT-PCR analysis of the NPTII and bromelain gene in T2 transgenic events. Lane M: 100bp DNA ladder, Lane WT: wild-type plant, Lanes 6-4~6-20: 5 different transgenic lines(A: NPTII primer, B: bromelain specific primer, C: β -actin primer).

Transgenic events 5계통과 wild type간의 bromelain 유전자의 발현정도를 비교하기 위하여 Real-time PCR을 실시하여 상대적 발현비를 그래프로 나타냈다(Fig. 2-35). 모든 Transgenic events는 wild type에 비하여 모두 높게 나타났으며, 발현량이 가장 높은 계통은 6-20이었다.

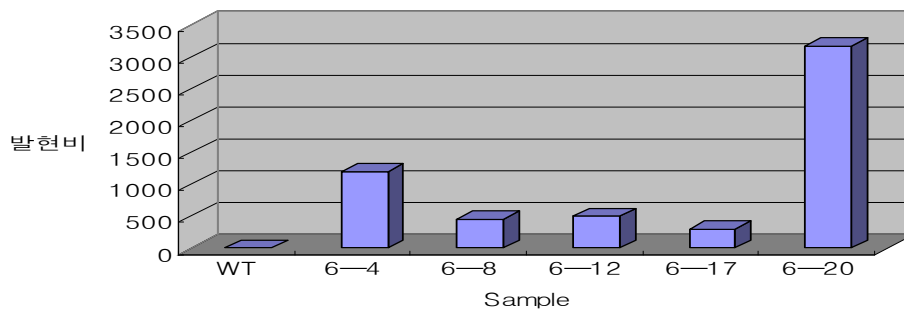


Figure 2-35. Expression of bromelain gene by Real-time PCR in T2 transgenic events.

6) T2 transgenic events의 무름병 내성

비형질전환체 및 transgenic events 3계통(6-4, 6-12 및 6-20)에 무름병균을 접종하고 시간 경과에 따라 발병엽율을 조사하였다. 접종 5일후의 상처접종에서 6-4 및 6-12는 wild type과 유사한 발병엽율을 나타냈으나, 6-20은 발병엽율이 75.3%로 낮게 나타났다(Table 2-20).

접종 5일후의 무상처 접종에서는 wild type, 6-4 및 6-12는 모두 100%의 엽발병율을 나타낸 반면, 6-20은 62%로 무름병 내성이 증진되었음을 알 수 있었다(Table 2-21).

금후, 6-20은 뿌리 썩음병 및 나방류의 내성에 관한 실험이 진행될 것이다. 또한 형질전환된 배추를 육종소재로 활용하여 내병충성 품종을 육성할 것이며, 단백질 가수분해 효소인 bromelain을 추출하여 사료첨가제, 가축의 유방염 치료제, 항주름 치료제, 각질박리 치료제, 및 보습효과가 탁월한 화장품 첨가제 등에 널리 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

Table 2-20. Pathogenicity of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *Carotovorum* isolated by 상처접종 in T2 transgenic events

| 접종 후 날짜 | 처리구 | 발병엽율(%)* | | | 평균 |
|-----------|-----------|----------|-----|-----|------|
| | | 1반복 | 2반복 | 3반복 | |
| 상처접종-2일 후 | wild type | 100 | 100 | 87 | 95.7 |
| | 6-4 | 76 | 88 | 72 | 78.7 |
| | 6-12 | 90 | 92 | 80 | 87.3 |
| | 6-20 | 45 | 50 | 33 | 42.7 |
| 상처접종-5일 후 | wild type | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | 6-4 | 100 | 100 | 90 | 96.7 |
| | 6-12 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | 6-20 | 80 | 70 | 76 | 75.3 |

*발병엽율(%) : 무름병에 감염된 식물체엽/개체당 식물체 전엽×100

Table 2-21. Pathogenicity of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *Carotovorum* isolated by 무상처접종 in T2 transgenic events

| 접종 후 날짜 | 처리구 | 발병엽율(%)* | | | 평균 |
|-----------|-----------|----------|-----|-----|------|
| | | 1반복 | 2반복 | 3반복 | |
| 상처접종-2일 후 | wild type | 18 | 25 | 20 | 21 |
| | 6-4 | 15 | 20 | 28 | 21 |
| | 6-12 | 15 | 33 | 20 | 22.7 |
| | 6-20 | 10 | 20 | 15 | 15 |
| 상처접종-5일 후 | wild type | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | 6-4 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | 6-12 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | 6-20 | 60 | 70 | 56 | 62 |

*발병엽율(%) : 무름병에 감염된 식물체엽/개체당 식물체 전엽×100

제3절 애기장대 응성불임 변이체를 이용한 임성관련 유전자의 분리 및 이용

1. 이론적 접근방법

가. F₂ mapping 집단 형성 위한 교배

Mapping 기본집단의 만들기 위해 12종의 응성불임 변이체들을 유전적 background가 다른 ecotype과 교배하였다. 본 연구에서는 사용되는 대부분의 변이체들이 WS-O 혹은 Nossen (No-O) ecotype 이므로, 이들을 Arabidopsis mapping에 일반적으로 사용되는 Columbia (Col)와 교배한 F₁ 종자를 심고, 이들 F₁ 식물에서 F₂ 종자 및 식물을 전개하였다 (그림 3-1). F₂개체의 표현형을 조사하고, 응성불임 변이를 보이는 개체들의 genomic DNA를 추출하여 molecular mapping을 위한 기본재료로 사용한다.

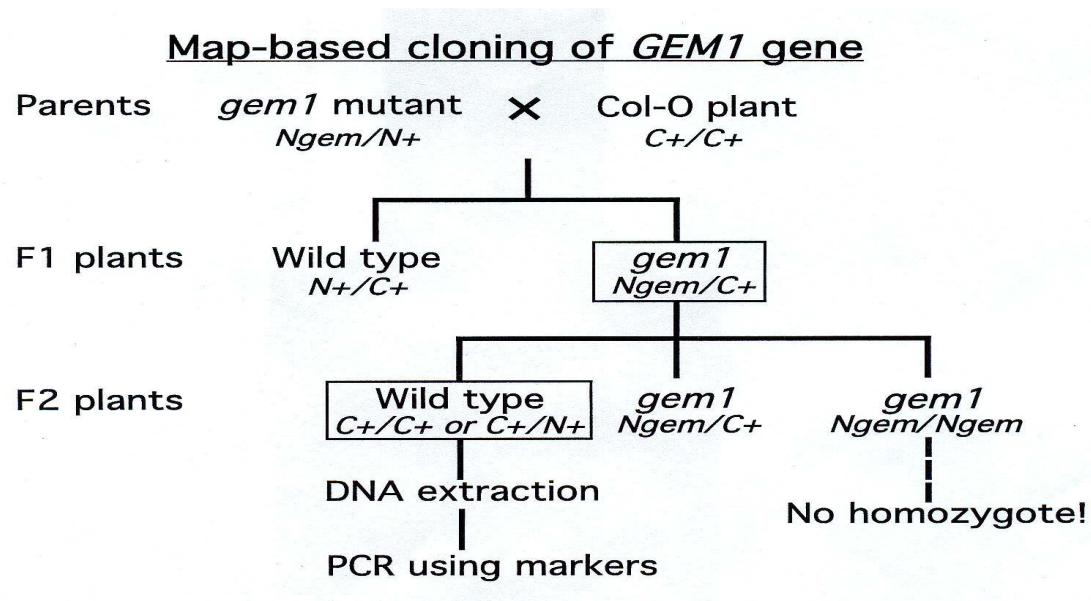


그림 3-1. Mapping 기본집단 조성 모식도

나. Molecular marker의 개발 및 제작

Ecotype에 관해 PCR 증폭상의 차이를 보이는 SSLP 분자마커를 제작하여 테스트한다. Arabidopsis database tair(<http://www.arabidopsis.org>)를 통한 분자마커에 관한 정보를 바탕으로 PCR primer를 제작하며, 필요한 경우 염기서열의 정보를 이용해서 새로운 마커를 디자인한다.

다. PCR에 의한 SSLP mapping

확보한 PCR-based SSLP marker를 이용한 SSLP (Simple Sequence Length Polymorphism) 기법을 이용하여 각 변이체의 연관군을 결정하였다. SSLP기법은 각 ecotype 계통상의 반복염기서열의 특징적인 길이의 차이를 이용하여 mapping하는 기법이다 (그림 3-2). 이미 Arabidopsis에 있어서 수백 개의 마커들이 보고되어 있어서 사용이 용이하

며, 지금까지 발표된 논문에 의하면 500 - 1000개체로 구성된 F₂ mapping 기본집단을 조성하였을 경우, 변이유전자를 함유한 지역을 염색체상의 물리적 거리로 100Kbp 이하까지 좁혀나갈 수 있다. 먼저 각 염색체의 장완 및 단완에 위치한 10개의 분자표지마커(표 3-1)들을 사용하여 변이가 위치하는 염색체를 결정하였다.

Simple Sequence Length Polymorphism (SSLP)

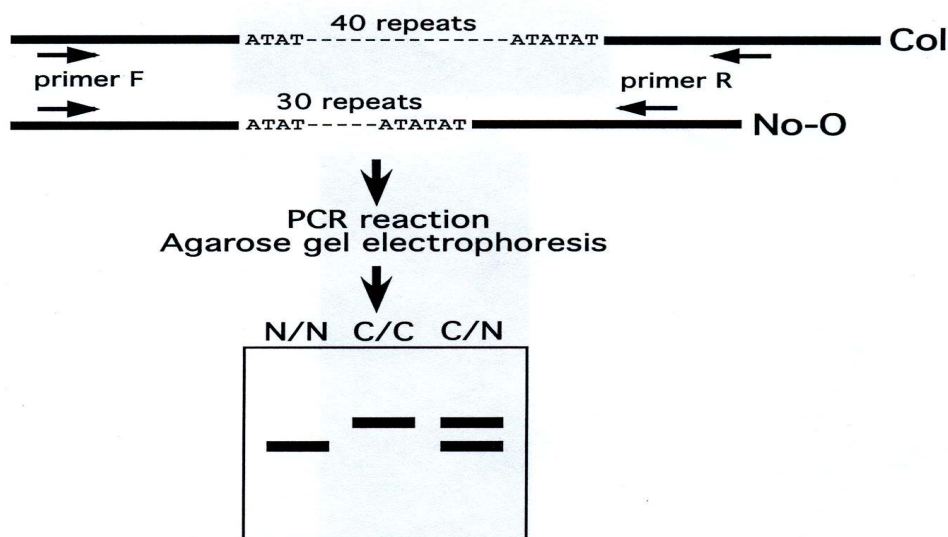


그림 3-2. SSLP mapping 원리의 모식도

다수의 SSLP marker들을 사용하여 20개 내외의 F₂ 개체들을 대상으로 *gem3* 및 *scp* mapping을 시도하였다. 이들 F₂ 개체들은 모두 정상형의 화분형태를 가지는 wild-type이며 *gem3* 변이체가 landsberg background이므로, *gem3* 유전자와 마커 간의 연관여부, 혹은 독립적으로 유전하는가는 다음과 같이 판별할 수 있다.

- 완전연관 혹은 매우 근접하게 연관: 대부분 Col/Col type.
- 연관되어 있으나 정도가 다소 약한 경우: 염색체상의 거리에 비례해서 Col/Ler type의 비중이 높아짐.
- 독립적인 유전의 경우: Col/Col:Col/Ler:Ler/Ler의 비율이 1:2:1에 가깝거나, 전체 중 Ler/Ler type의 비율이 높을 것으로 예상.

scp mapping 역시, 유전적 background가 No-O인 점만 고려하며 *gem3* 와 동일한 방법으로 수행하였다.

PCR산물들을 4% agarose gel에서 전기영동 후 밴드크기의 차이로 각 개체들의 유전자형을 관별하였다(그림 3-3).

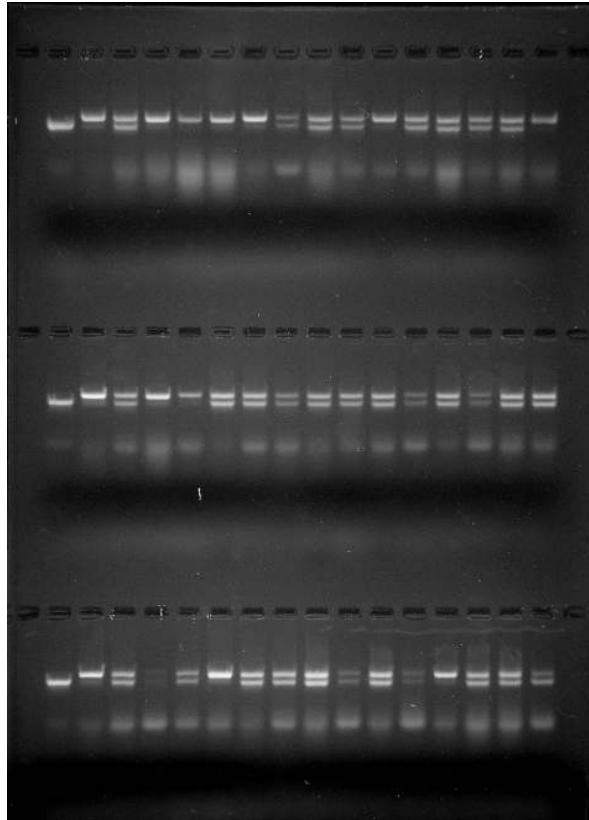


Figure 3-3. Electrophoresis of PCR products on 4% agarose gel using SSLP primers.

마. Knock-out 삽입변이주의 표현형 분석, genetic complementation용 벡터 구축 및 형질전환

애기장대에서 가능성 있는 해당유전자가 동정되면 다음의 2가지 방법으로 유전자를 확인한다. 먼저 유전자를 포함하고 있는 BAC 염기서열을 이용하여 genetic complementation을 위한 형질전환용 binary 벡터를 구축하여 변이체를 대상으로 이미 애기장대 식물에서 확립된 floral dipping방법에 의해 형질전환을 수행한다. 두 번째 방법으로 해당 유전자 위치에 T-DNA 혹은 Ds element가 삽입된 knock-out 삽입 변이체를 애기장대 종자은행의 database상에서 확인한 후 종자의 분양을 요청하여 표현형을 분석한다. 만약 동일한 표현형이 관찰되면 변이를 유발하는 동일한 유전자임을 확인하는 직접적인 증거이므로 genetic complementation을 위한 벡터 구축 및 형질전환과정을 생략할 예정이다.

2. 실험적 접근방법

가. 웅성불임 변이체의 표현형적 특성의 연구

웅성불임 변이체의 화분 및 약(anther)발달과정을 단계별로 DAPI를 이용하여 핵의 염색하여 변이형을 검정하였다. 또한 필요한 경우 화분의 생명력을 검정 및 callose 축적여부를

조사하기 위하여 FDA, Aniline blue를 이용한 형광염색을 이용하였다. 특히 Aniline blue는 화분 발달과정의 제1유사분열시 생식세포벽(주성분이 callose로 이루어져 있음)을 염색하는데 유용하게 사용되어 비동형분열의 정도를 판단하는데 유용하게 사용되었다. 또한 웅성불임 변이성에 관한 발생학적 원인을 규명하기 위하여 웅성 자성의 생식조직의 sectioning 및 clearing을 통하여 세포, 조직의 내부의 변화를 관찰하였다. 이러한 연구에는 광학현미경, 해부현미경, 형광현미경 및 전자현미경(SEM, TEM), Nomaski Optics를 이용하여 수행하였다.

나. 변이주의 특성 연구 및 불임기구 구명

기본적인 세포학적 분석방법 이용하여 성숙화분의 표현형을 조사하였다. 핵 및 DNA를 효과적으로 염색하는 DAPI시약을 이용한 성숙화분을 염색한 후 형광현미경의 UV하에서 관찰하였다. 성숙한 꽃 3개를 300 μ l의 DAPI염색용액(0.1M sodium phosphate pH 7, 1mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.4 μ g/ml DAPI)이 들어있는 E-tube에 넣어 5분간 incubation 후, vortexing 원심분리를 통하여 화분을 채취하였다(Development 125:3789).

다. 애기장대 *gem3* 및 *scp* 유전자의 배추에서의 유전자 기능연구

애기장대의 해당 유전자를 배추의 계놈에서 동정 분리한 후, 기본적인 유전자의 특성을 규명하고 그 결과를 애기장대와 비교분석한다. 배추계놈에서의 동정은 농업생명공학 연구원의 배추계놈팀에서 이미 확보하고 있는 EST database를 탐색하여 동정할 예정이며, 만약 원하는 EST가 없을 경우 타 방법(예: 배추 genomic/cDNA library screening)을 모색할 예정이다.

라. 배추유전자를 분리 후, 이를 이용한 벡터구축(RNAi vector)을 구축

지금까지 논문으로 보고된 10여 종의 애기장대 불임유발 유전자들을 배추계놈에서 search하여 배추의 해당유전자를 분리한 후, 이를 이용하여 발현억제를 위한 벡터구축(RNAi vector)을 수행할 예정이다. 먼저 애기장대 database에서 유전자의 정보(gene accession no. 염기서열 등)를 수집한 후, 이를 이용하여 농업진흥청 생명공학연구소에서 구축한 배추 EST database를 search할 계획이다. 현재 20,000개 이상의 배추 EST유전자 정보를 보유하고 있는 배추 EST database를 이용하기 위해서 배추계놈연구팀과 협의를 할 예정이다. 애기장대의 불임유발 유전자에 해당하는 배추의 유전자의 정보를 확보하게 되면, 이를 이용하여 발현억제를 위한 RNAi vector를 제작할 계획이다. RNAi vector를 위한 기본벡터로는 pCAMBIA3301을 사용할 예정이며, 식물체에 도입되는 유전자의 발현억제가 화기조직 및 화분에서만 제한되도록 벡터내의 CaMV35S promoter를 anther-, pollen-, tapetum-specific promoter로 교체할 예정이다. 현재 사용하기 위하여 확보될 promoter로는 애기장대 및 토마토에서 화분 특이성이 확인된 LAT52 promoter 및 담배에서 확인된 NTM19 promoter를 사용할 계획이다. 이상과 같이 잠재적 가능성이 높은 불임유발 배추유전자를 이용하여 배추의 인위적인 불임유발이 가능하게 되면 본 연구의 최종목표 달성을 단축할 가능성을 높다고 판단된다.

마. Jasmonic acid(JA)생합성경로에 관여하는 Allene Oxidative Synthase(AOS)유전자를 이용한 conditional GMS 애기장대 및 배추 형질전환체의 육성

웅성불임 유발 및 회복을 위한 vector제작을 위한 이론적 배경: F₁ 잡종종자의 효율적인

생산을 위해서는 통상적으로 3계통-웅성불임친, 웅성불임 유지친, 임성회복친-을 이용하는 3계통법을 사용한다. 본 연구에서는 유전자 조작을 통하여 임성조절이 가능한 웅성불임친을 만들어 최종적으로 배추 1대 잡종종자 생산시 웅성불임 유지친이 필요치 않은 2계통법의 확립하려한다. 불임유발/임성회복 기작을 위하여 JA 생합성과정의 AOS유전자를 이용하였다.

JA는 식물에서 많은 생리적 기능을 가지고 있지만, 특히 애기장대에서의 화분발달에 있어서도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 JA합성유전자 가운데 하나인 AOS유전자발현을 억제하여 JA의 합성을 억제함으로써 웅성불임을 유도하고자 한다. 이 방법으로 만들어 진 웅성불임식물체는 개화시기에 외부에서 JA을 처리할 경우 다시 웅성을 회복할 수 있을 것으로 기대하고 있다. 결과적으로 조절 가능한 웅성불임 식물체를 생산하는 것을 목표로 한다. 배추의 AOS유전자의 cDNA 일부(약 0.5 kb)를 PCR로 증폭한 다음 pGEM-T vector에 cloning한다.

유전공학적인 방법으로 웅성불임을 유발하기 위해서는 웅성에서만 특이적으로 발현하는 프로모터를 찾아야 한다. 웅성기관의 불임을 유도할 외부 유전자의 발현이 다른 기관에는 피해를 주지 않도록 해야 하기 때문이다. 배추의 promoter에 관하여 이용할 수 있는 정보가 현재까지 매우 제한적이므로 애기장대에서 확인된 웅성기관 특이적 발현 promoter-*duo1*, *AtGEX2*, *AtVEX1*, *msp2*, *lat52*-들을 이용할 예정이다. PCR을 이용하여 각각 5'-UTR을 포함하여 약 1-2 kb의 프로모터 부위를 분리한 후, PCR로 증폭된 DNA를 pGEM-T vector에 cloning한다.분양받은 binary vector, pK7gwiwGL의 multi-cloning site에 프로모터를 삽입하여 원하는 프로모터에 의해 조절되는 RNAi 구조를 gateway cloning 방법으로 제작한다.

3. 연구결과

가. 애기장대 임성관련 변이체의 특성조사 요약

1) *gem2*변이체의 특성조사

애기장대 화분발달 관련 12종의 변이주를 연구재료로 사용하여 돌연변이의 특성을 세포생물학적 기법을 사용하여 분석하였다. *gem2* 변이주는 화분발달과정상의 제1 유사분열시 비정상적인 세포분열현상을 보였으며(그림 3-4), 이로 인해 생식세포 및 영양세포로 분열하는 전형적인 비동형분열인 화분 제1 유사분열이 동형분열을 양상을 보이고 그 후의 daughter cell fate가 변하게 된다(그림 3-4, 그림 3-5). 또한 *gem2*변이주는 자성배우지인 배낭세포의 발달에도 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다(그림 3-6). 배낭세포를 구성하는 중심세포, 난세포 조세포등을 명확하게 구분하는 세포벽이 관찰되지 않으며, 시간이 경과함에 따라 이들이 자연스럽게 융합하여 거대한 핵을 형성하였다(그림 3-6 E, F, G, H). 이상의 결과로 볼 때, 배낭세포의 cellularization이 정상적으로 일어나지 않는 것으로 판단된다. 이와 같은 변이주의 특성을 전자현미경 및 세포생물학적 기술을 이용하여 상세히 규명하여 국제 학술지에 연구 결과를 발표하였다.

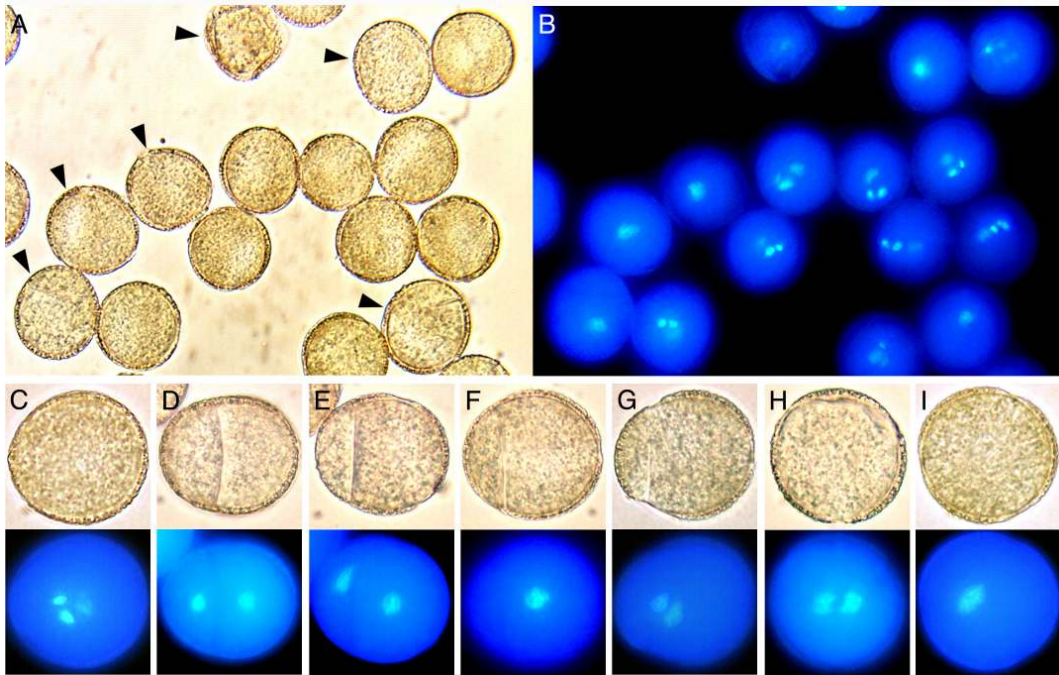


그림 3-4. 광학현미경 및 DAPI 염색 후 형광현미경을 이용하여 관찰한 *gem2* 변이주의 성숙화분 표현형 비교.

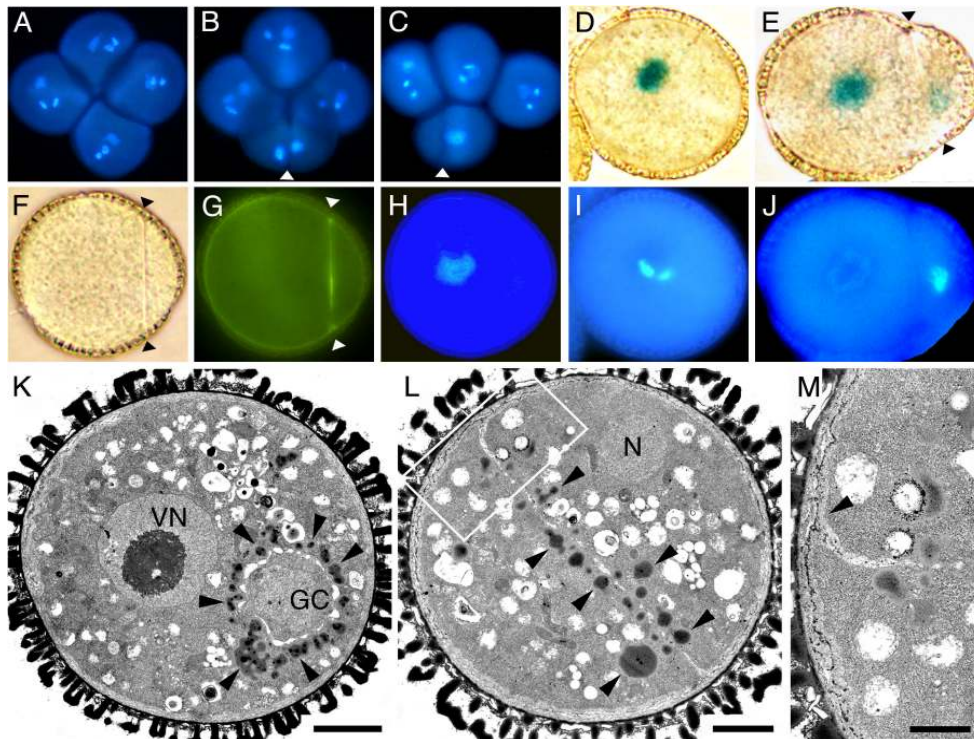


그림 3-5. *gem2* 화분의 세포분열 축(B, C) 및 세포 운명(D, E, I, J)의 분석. aniline blue(F, G, H) 및 TEM(K, L, M) 이용한 세포 내벽의 특성 검정. 정상화분(A, D, I, K); *gem2* 화분(B, C, E, F, G, H, J, L, M)

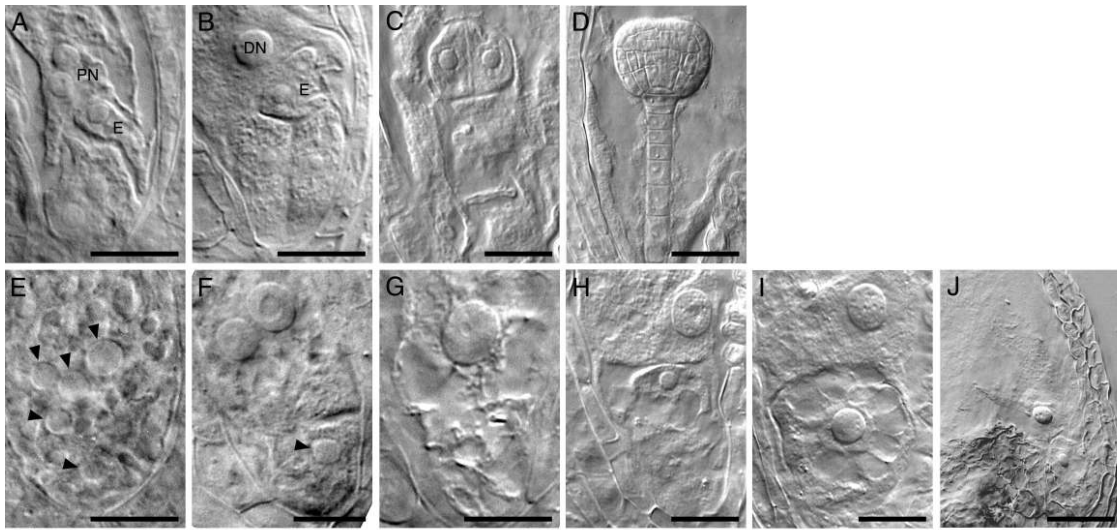


그림 3-6. 정상형(A-D) 및 *gem2*변이주(E-J)의 배 발달과정

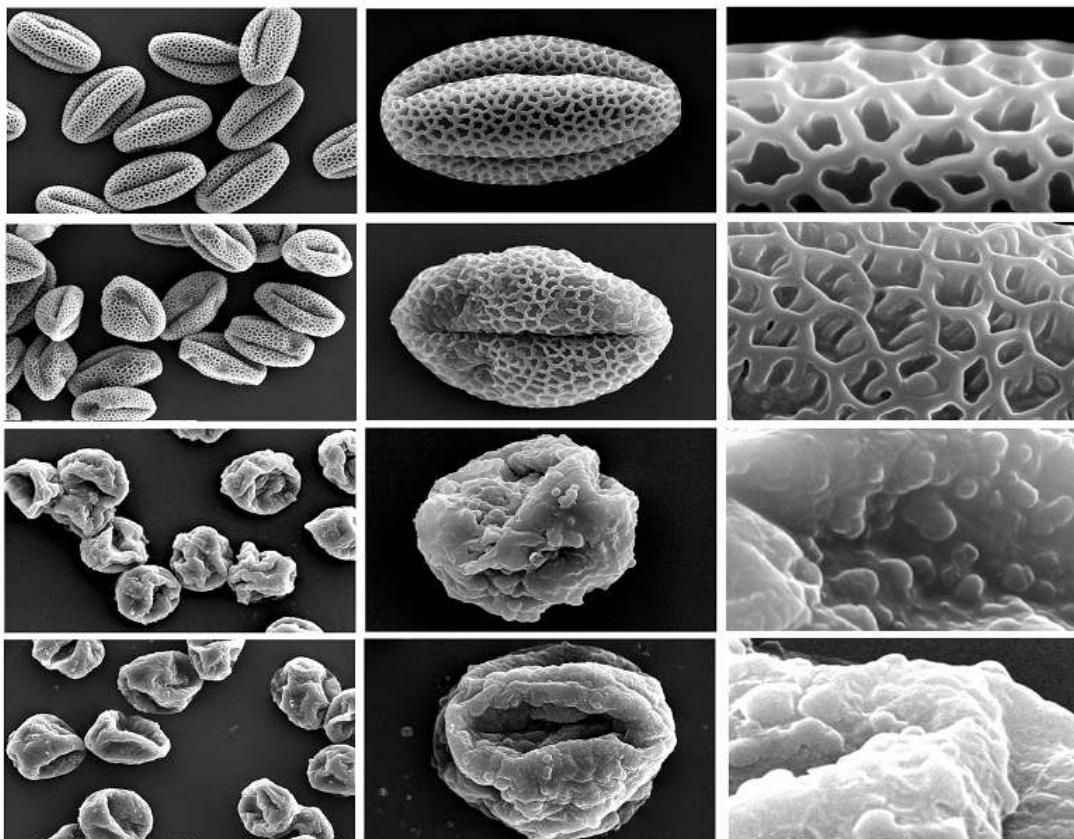


그림 3-7. *pow*변이주의 성숙화분 외벽(exine)의 특징적인 pattern. 1열: 정상화분, 2열: *pow1*, 3열: *pow2*, 4열: *pow3* 변이화분

2) *pow*변이체의 특성조사

*pow*변이주는 전자현미경 SEM 분석결과, 화분외벽을 형성하는 exine 패턴의 이상현상을 보이는 특성을 가진 변이주로 판명되었다(그림 3-7). 그림 3-7에서 보는 것처럼 선발된 3종

의 변이체들이 서로 간 변이의 정도에 상당한 차이를 보였다. *pow1*이 약한 화분 외벽의 변이특성을 보이며, *pow2*와 *pow3*는 강한 변이형을 보였다(그림 3-7). 현재 다양한 염색방법 및 전자현미경을 이용한 TEM analysis을 통하여 보다 정밀한 mutant exine의 특성을 규명할 필요성이 있다.

3) *sfi* 변이체의 특성조사

sfi 변이체는 화사가 완전하게 신장하지 못하여, 길이가 정상형에 비해 절반정도 밖에 되어 얇아 불임현상을 보였으며(그림 3-8), 이미 보고된 GA생합성 유전자의 변이주와 비슷한 특성을 보이므로 동종의 변이주일 확률이 높다. 총 4종의 비슷한 표현형을 보이는 변이체를 선발하여 상세한 특성규명이 진행 중이다.

4) *dan* 변이체의 특성조사

dan 변이체는 감수분열과정에 이상현상으로 인해 정상적인 화분이 생산되지 않는 특성을 보였으며(그림 3-8), 현재까지의 문헌조사결과 식물생식 과정에 특이적으로 작동하는 transcription factor를 encode하는 유전자에서 돌연변이가 유발되었을 가능성이 있다고 판단된다.

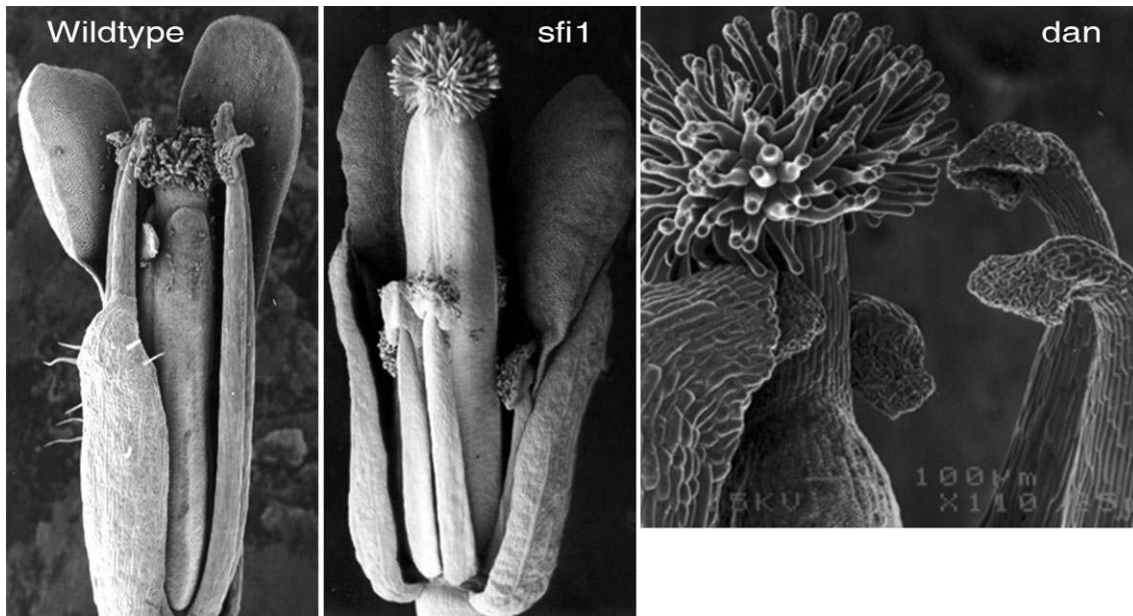


그림 3-8. 정상형, *sfi1*, *dan* 변이형의 꽃의 구조에 관한 SEM 분석.

나. 12종 애기장대 화분발달 관련 변이주의 유전분석

1) 임성관련 변이주의 mapping 수행

변이유전자의 분리하기 위한 첫 단계로서 molecular mapping을 수행하였다. 먼저 PCR반응을 이용한 SSLP mapping에 사용할 목적으로 30여종의 primer를 제작하고, 이들을 검정하여 mapping 기본집단을 만드는데 사용한 2개의 ecotype(WS-0와 Col-0, No-0와 Col-0)에서 염기반복서열의 길이의 차이에 의한 명확한 다형화현상을 보이는 22종의 primer를 분자마커로 사용하여 mapping작업을 수행하였다. 현재 총 12종의 애기장대 화분발달 관련 변이주 중 5종에 관해서 변이유전자의 염색체상의 대략의 위치를 결정하였다.

2) *gem2* 변이체의 유전분석 및 mapping 수행결과 요약

gem3 돌연변이는 5번 염색체의 분자마커 *ciw9*과 *nga129* 사이(약 87cM)에 위치함이 밝혀졌다. 또한 웅성 및 자성 배우자를 통한 후대로의 유전적 전이정도가 감소됨이 확인되었다. 이 결과 변이주의 자식세대를 분석한 결과 단지 30%의 자식개체들만이 변이형을 보였다. 또한 이들 모든 변이주들은 이형접합체(Heterozygote)임이며, 동형접합체는 발견되지 않았다. 이러한 비정상적 유전적 전이 현상의 원인을 규명하기 위하여 reciprocal test cross를 수행함으로써 웅성 및 자성 배우자를 통한 각각의 전이정도를 분석하였다. 웅성배우자인 화분의 경우 11%, 자성배우자인 배낭세포의 경우 23%만이 후대로 전이됨이 밝혀졌으며, 이로 인해 이론적으로 자식 후 후대에서 약 2%의 동형접합체의 출현빈도를 기대할 수 있으며, 본 연구팀에서 약 300개체를 분석하였으나 발견되지 않았다. 이는 동형접합체의 경우 수정 후 배 발달 과정에 심각한 결함을 가지는 것으로 사료되며, 실제로 Nomaski Optics 방법에 의해 배 발달 과정을 분석한 결과와도 일치하였다(그림 3-6 참고).

3) *pow* 돌연변이(*pow1*, *pow2*, *pow3*) 변이체의 유전분석 및 mapping 수행결과

pow 변이체들은 1번 염색체 상위지역에 위치하는 분자마커(F6F3A, F6F3B, T1N6A, T7I23)이 용하여 변이 유전자의 위치를 결정한 결과, 모두 1번 염색체의 상위지역에 위치하였으며, 3종 모두 유전자들이 1번 염색체의 상위부분에 위치하는 것으로 밝혀졌다. 각 분자 마커를 이용하여 120여 F₂ 개체를 분석하였을 경우 recombinant chromosomes와 non-recombinant chromosomes 수 등, *pow1*에 관해 분석한 결과는 Table 3-2와 같다.

Table 3-2. Table showing the numbers of recombinant and non-recombinant chromosomes and recombination frequency for each of the markers F6F3A, F6F3B, T1N6A and T7I23 for the *pow1* mapping population

| Mutant line: <i>pow1</i> | Marker | | | |
|------------------------------------|--------|-------|-------|-------|
| | F6F3A | F6F3B | T1N6A | T7I23 |
| No. of plants screened | 213 | 213 | 213 | 213 |
| No. successful PCR | 120 | 121 | 122 | 123 |
| No. recombinant plants C/N | 0 | 2 | 3 | 5 |
| No. non-recombinant Plants N/N | 120 | 119 | 119 | 118 |
| No. of recombinant chromosomes | 0 | 2 | 3 | 5 |
| No. of non-recombinant chromosomes | 240 | 240 | 241 | 241 |
| Total No. of Chromosomes | 240 | 242 | 244 | 246 |
| Recombination frequency (%) | 0 | 0.826 | 1.230 | 2.033 |

이 분석결과에 의하면 *pow1* 변이는 1번 염색체 상위지역에 위치한 2개의 BAC 지역내에 위치하며, 이 지역의 물리적 길이는 약 106Kbp 정도이며, 이 지역 내에 Table 3-3에 list된 38개의 유전자가 존재하는 것으로 확인되었다. 현재 변이유전자가 위치한 지역을 더욱 좁히기 위한 fine mapping 작업이 수행하였다. *pow1*, *pow2*, *pow3*, 3종 변이주에 관하여 서로간의 allelism을 분석하여 서로 독립적인 변이주 임이 확인되었으며, *pow2*, *pow3*에 관해서도 동일한 mapping 작업이 수행중이며, 현재 새로운 SSLP 마커를 제작하여 유전자가 위치한 염색체의 지역을 좁혀나갈 필요가 있다.

Table 3-3. showing the genes in the mapping region for *pow 1* including gene function if known

| BAC | Atg No. of Gene | Gene Function |
|--------|-----------------|---|
| T25K16 | 01010 | NAC domain protein, putative |
| | 01020 | Unknown protein |
| | 01030 | DNA-Binding protein, putative |
| | 01040 | DEAD/DEAH box helicase carpel factory (CAF) |
| | 01050 | Soluble inorganic pyrophosphatase, putative |
| | 01060 | DNA-Binding protein, putative |
| | 01070 | Expressed protein |
| | 01080 | Chloroplast RNA binding protein cp33, putative |
| | 01090 | Pyruvate dehydrogenase E1 alpha subunit |
| | 01100 | Acidic ribosomal protein, putative |
| | 01110 | Expressed protein |
| | 01120 | Fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase 1 |
| | 01130 | Hypothetical protein |
| | 01140 | Serine threonine kinase, putative |
| | 01150 | Hypothetical protein |
| | 01160 | Unknown protein |
| | 01170 | Unknown protein |
| | 01180 | Hypothetical protein |
| | 01190 | Cytochrome P450, putative |
| F6F3 | 01200 | GTP-binding protein |
| | 01210 | Hypothetical protein |
| | 01220 | Hypothetical protein |
| | 01225 | Expressed protein |
| | 01230 | Expressed protein |
| | 01240 | Expressed protein |
| | 01250 | Transcription factoe TINY, putative |
| | 01260 | |
| | 01270 | bHLH protein |
| | 01280 | Cytochrome p450 family |
| | 01290 | Molybdopterin biosynthesis CNX3 protein, putative |
| | 01300 | Chloroplast DNA binding protein, putative |
| | 01310 | Pathogenesis related protein, putative |
| | 01320 | Hypothetical protein |
| | 01330 | Hypothetical protein |
| | 01340 | Cyclic nucleotide-regulated ion channel |
| | 01350 | Hypothetical protein |
| | 01360 | Expressed protein |
| | 01370 | Histone, putative |

4) *sfi* 돌연변이의 유전분석 및 mapping 수행결과 요약

sfi 돌연변이는 총 4종의 비슷한 표현형을 보이는 변이체를 선발하여 mapping analysis 및 allelism test가 수행하였으며. 현재까지의 연구결과 *sfi1*은 4번 염색체의 상위지역에 위치한 것으로 밝혀졌다. 지금까지 사용된 이들 분자마커들은 현재 F₂ mapping 기본집단을 구성하

고 있는 응성불임 변이주-*dan*, *sfi2*, *sfi3*, *sfi4*-에 대해서도 유용하게 사용될 것으로 판단된다.

12개의 임성관련 애기장대 대상으로 변이체의 특성조사 및 유전분석 결과 *sidecar pollen(scpl)* 및 *geminipollen3(gem3)* 변이체가 유전자클로닝을 위한 변이체로 가장 적합한 것으로 밝혀졌으며, 또한 유전자가 규명 되었을때 농업적 활용가능성이 가장 큰 것으로 판단되어 정밀한 특성조사 및 정밀유전자 지도 작성(map-based gene cloning)을 통한 유전자탐색연구를 계속 수행하였다.

다. *geminipollen3* 변이체의 불임기구 구명을 위한 특성 연구 및 유전분석 결과

1) Heterozygous *gem3*의 화분 표현형 분석

변이유전자가 이형접합(*gem3* mapping수행과정에서 heterozygote상태임을 확인)인 3개의 개체에서 1000개 이상의 화분을 채취하여 관찰한 결과, 변이형 화분의 비율이 35.6%였다. 이들 중 15.3%의 화분들은 비정상적 세포분열을 보였다. 이러한 현상은 변이화분 내에서 뚜렷하게 관찰되는 이상 세포벽 구조에 의해 알 수 있으며, 정상화분을 관찰되지 않았다. 15.3%의 변이형 화분에서 다음과 같은 표현형들이 관찰되었다(그림 3-9).

- 분열로 형성된 2개의 세포부분이 모두 하나의 핵을 함유함

- 2개 세포 중 한개 만이 핵을 함유함

- 한 개의 세포에서 2개의 핵이 관찰되며, 나머지 세포는 핵을 함유하고 있지 않음

변이형 화분 중 8.4%는 한 개의 핵을 함유하면서 세포벽의 구조가 전혀 관찰되지 않는 변이형(*solo pollen; solo* 및 *two-in-one; tio*), 세포벽 및 1-2개의 핵은 관찰되는 영양세포의 세포질에 외부로 유출된 type인 *bursting pollen*의 표현형을 보였다(그림 3-9). 변이형 화분 중 11.9%는 화분의 전체 형태가 비정상적으로 찌그러진 화분형태를 보였으며, 변이화분들은 강한 형광을 보이거나 혹은 전혀 형광을 나타내지 않았다.

2) Homozygous *gem3*의 화분 표현형 분석

변이유전자가 동형접합(*gem3* mapping수행과정에서 homozygote상태임을 확인)인 개체에서 관찰한 결과 변이형 화분의 비율이 100%였으며, 정상화분은 관찰되지 않았다(그림 3-9). DAPI 염색결과 강하게 염색되는 2개의 정세포(sperm cell)와 넓게 약하게 염색되는 1개의 영양세포 핵을 보이지만, 전체 화분의 크기가 정상화분의 2-3배인 극대형 화분 혹은 반 이하의 크기로 판단되는 극소형 화분의 새로운 변이형이 관찰되었다. 이러한 변이화분들은 전체의 22.9%를 차지하였다.

Phenotypes of *gem3* mature pollen

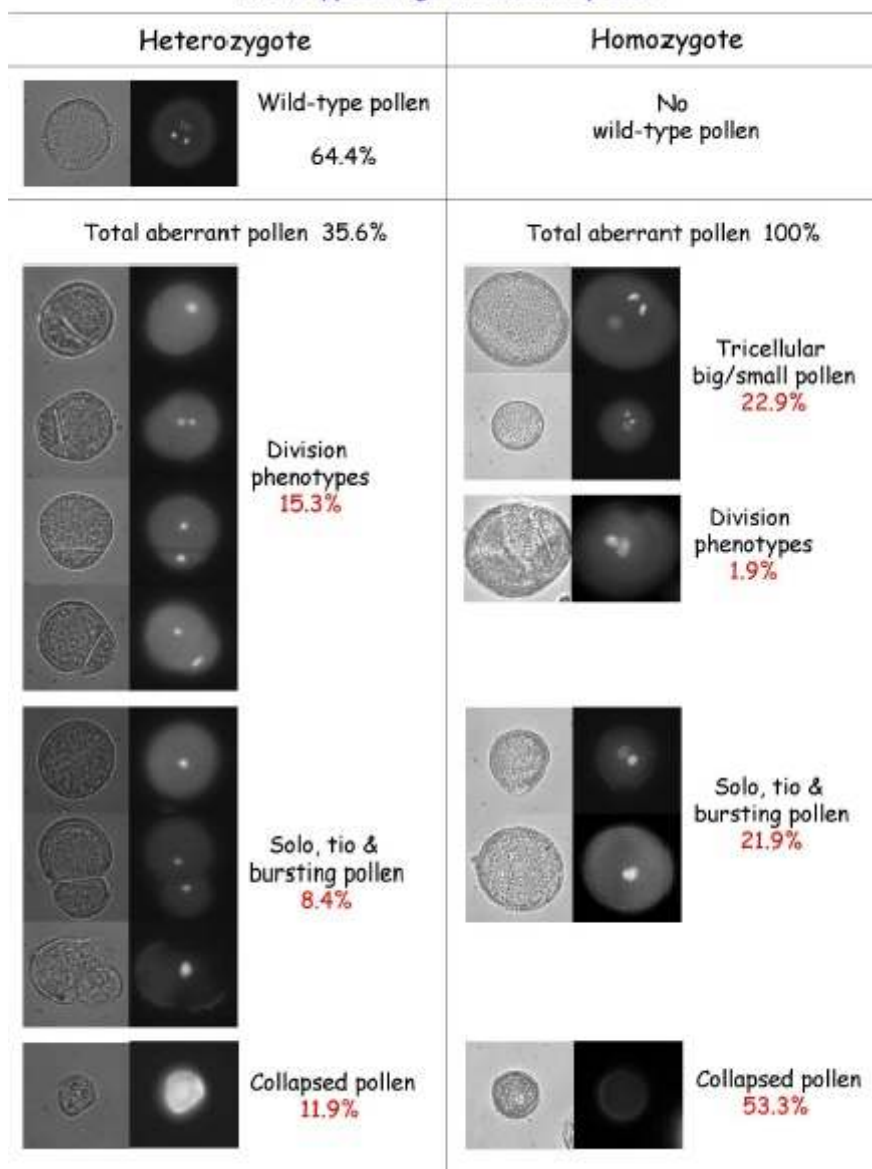


Figure 3-9. Pollen phenotype analysis of *gem3* mutants

이상분열형은 가장 낮은 비율(약 1.9%)로 존재했는데, 흥미롭게도 이는 이형접합 변이체에서의 관찰 결과(전체 변이형의 약 43%로 가장 높은 비율로 존재)와 정반대되는 흥미로운 결과이다. 현재 진행 중인 map-based cloning을 통하여 변이유전자가 분리되어 유전자 기능분석이 수행되면, 이러한 현상에 관한 해석이 가능할 것으로 예상된다. 변이형 화분 중 21.9%는 핵은 존재하나 이상 세포벽의 구조가 없는 *solo/tio* type, 세포질에 외부로 유출된 type인 bursting pollen의 표현형을 보였으며, 전체 변이형의 53.3%의 화분들은 비정상적으로 찌그러진 화분형태를 보였다. 100%의 변이형 화분을 근거로 예측한 것과 동일하게, 조사는 모든 동형접합형의 변이개체들은 종자를 전혀 형성하지 못하는 심각한 불임현상을 보였다.

이상의 화분표현형의 분석결과 다음과 같은 결론을 획득하였다. *gem3* 변이체는 비정상적

분열현상으로 형성된 일부 세포들이 2개의 핵을 함유하고 있거나, 핵을 함유하고 있지 않은 표현형을 보이는 것으로 보아, 감수분열 후 소포자 발달과정동안 핵분열은 정상적으로 일어나, 분열된 2개 핵의 중간이 아닌 다른 위치에서 세포질 분열이 일어나는 것으로 판단된다. 또한 내부 세포벽 구조가 없고 한 개의 세포만을 함유하는 *sole/tio* type이 다수 관찰되는 것으로 보아, 세포질분열 자체가 일어나지 않을 가능성도 있다. 이러한 결과로 볼 때, 이미 보고된 유사한 변이체인 *gem1* (Development 125:3789; Plant Physiology 126:899) 및 *gem2*(Sexual Plant Reproduction17:63)의 변이화분 발달단계의 분석결과를 토대로 유추할 때, 화분 제1 유사분열 시기에 비정상적 분열의 결과 형성되는 세포판(cell plate)형태로 최초로 발생하여 성숙과정동안 화분 내부의 안정한 세포벽의 구조로 발달하여 변이형으로 고착될 가능성이 높다고 판단된다. 이상의 결론으로 종합적으로 판단할 때, 변이유전자가 세포분열, 세포주기(cell cycle) 혹은 세포질 분열(cytokinesis)에 관여하는 유전자일 가능성이 높다. 동형접합 *gem3* 개체에서 보이는 불임현상은 웅성배우자의 결함에 기인하는 웅성불임인 것으로 판단되며, 향후 유전자가 분리되었을 경우 농업적 이용 가치가 클 것으로 예상된다.

3) *gem3* 유전분석결과

1). *gem3* mapping 기본집단의 조성

gem3 fine mapping을 위하여 Arabidopsis ecotype Columbia(Col-0)의 화분을 변이체의 주두에 인공수분하여 수 개의 F₁ 개체들을 성장실 환경에서 키운 후, 화분의 표현형을 관찰하였다. 교배에 사용된 변이체가 이형접합체(heterozygote)의 상태이므로, F₁개체들은 정상형 혹은 변이형의 화분표현형을 보였다. 이들 중 변이형을 보이는 2개 F₁ 개체의 종자를 파종하여 총 579개의 F₂ 개체를 전개하였다. 579개의 F₂개체들의 유전적 분리비를 조사한 결과는 변이형과 정상형의 분리비가 56:44였다(표 3-4). 이는 정상적인 멘델의 분리비를 보일 경우, 기대되는 75:25와 상당한 차이를 보인다. 이러한 비정상적 유전적 분리현상은 웅성배우자 및 자성배우자들의 후대로의 유전적 전이(genetic transmission)가 완전하지 않은데 기인하는 것으로 판단되었다. 각 배우자들의 전이율을 reciprocal cross를 통하여 조사한 결과, *gem3*의 자성배우자들은 정상적으로 전이하여 수정에 참여하는 반면, 웅성배우자의 경우 10%이하로 감소하는 것으로 밝혀졌다.

Table 3-4. Segregation analysis of F₂ mapping population of two mutant F₁ plants originated from crosses of heterozygous *gem3* and Col-0.

| F ₁ Parents | No. <i>gem3</i> heterozygote | No. <i>gem3</i> homozygote | No. wild-type | No. tested plants |
|-------------------------------|------------------------------|----------------------------|---------------|-------------------|
| <i>gem3</i> F ₁ -1 | 162 | 24 | 109 | 295 |
| <i>gem3</i> F ₁ -7 | 125 | 13 | 146 | 284 |
| Total No. | 287 | 37 | 146 | 579 |
| Total % | 49.6% | 6.4% | 44.0% | 100% |

2). Map-based cloning을 위한 *gem3* fine mapping

9개의 SSLP marker들을 사용하여 16개의 F₂ 개체들을 대상으로 *gem3* mapping을 수행하였다. 5번 염색체의 50.48cM에 위치한 nga139 마커로 분석한 결과 C/L type이 전체의 반인 8개체, C/C type 7개인 반면 L/L type은 한 개에 지나지 않았다(표 3-5). 이 결과는

nga139 마커의 약한 정도의 연관을 나타내는 것으로, *gem3* 유전자가 5번 염색체상에 위치함을 강하게 시사하며, 비록 집단 크기가 작아 부정확하지만 약 25%인 재조합가로 볼 때 마커와 25–30cM 떨어져 있는 것으로 예측된다.

Table 3-5. Experimental results of *gem3* mapping

| No | Chr. | Chr. #1 | | Chr. #2 | | Chr. #3 | | Chr. #4 | | Chr. #5 |
|----|------|---------|--------|---------|--------|---------|-------|---------|--------|---------|
| | Name | nga63 | nga280 | ciw2 | nga168 | nga162 | nga6 | nga8 | F27G19 | nga139 |
| | cM | 11.48 | 83.83 | 10.0 | 73.77 | 20.56 | 86.41 | 26.56 | 48.5 | 50.48 |
| 1 | F5 | L | C | C/L | No amp | C | C | C | C/L | C/L |
| 2 | F10 | C/L | C/L | C/L | No amp | C | C | L | C/L | C |
| 3 | F13 | C | C | C/L | No amp | No amp | C/L | C/L | L | C/L |
| 4 | F18 | L | C/L | C/L | L | C/L | C/L | L | L | C |
| 5 | F27 | L | L | C | C/L | C/L | C | C | L | C |
| 6 | F28 | L | C | C/L | C | L | C/L | L | L | C/L |
| 7 | F29 | C/L | C/L | L | L | C | L | C/L | C/L | C/L |
| 8 | F32 | C | L | L | C | L | L | C/L | L | L |
| 9 | F35 | C/L | L | C | No amp | No amp | L | L | L | C/L |
| 10 | F40 | C/L | L | L | No amp | C/L | C | L | C/L | C |
| 11 | G1 | – | – | – | – | – | – | L | C/L | C |
| 12 | G2 | – | – | – | – | – | – | C/L | C/L | C |
| 13 | G5 | – | – | – | – | – | – | C | C | C/L |
| 14 | G7 | – | – | – | – | – | – | C/L | C/L | C/L |
| 15 | G11 | – | – | – | – | – | – | C/L | C/L | C/L |
| 16 | G14 | – | – | – | – | – | – | C/L | C/L | C |

* Genotype– L: Ler/Ler, C: Col/Col, C/L: Col/Ler, No amp: Not amplified with PCR marker.

고해상도 정밀 유전자 지도를 작성하기 위하여 아래와 같은 5번 염색체상에 위치하는 9종의 SSLP 및 sequencing용 마커를 제작하였다(표 3-6). 5번 염색체의 71cM – 94cM 사이에 위치한 7개의 마커를 사용하여 fine mapping을 수행하였다. 정상형의 화분표현형을 보이는 234개 F₂ 개체로부터 genomic DNA를 추출하여 분석한 결과 최종적으로 MPO12a 마커 위치에서 2개의 재조합개체를 확인하였으며, 반대편의 MYC6a 마커 위치에서 2개의 재조합개체를 발견하였다(분석 개체수가 매우 많으므로 전체 분석결과표 생략함).

30–40% 변이형의 화분 표현형을 보이는 269개 F₂ 개체(heterozygous *gem3* mutant)로부터 genomic DNA를 추출하여 분석한 결과 최종적으로 MPO12a 마커 위치에서 2개의 재조합개체를 확인하였으며, 반대편의 MEE6a 마커 위치에서 2개의 재조합개체를 발견하였다(분석 개체수가 많으므로 전체 분석결과표 생략함).

Table 3-6. SSLP markers used for *gem3* fine mapping chromosome #5.

| Markers (Accession No.) | Sequence | Class of markers Map position | Product lengths | |
|----------------------------|------------------------------|----------------------------------|-----------------|--------|
| | | | Col-O | Ler |
| AthPHYC | CTCAGAGAATTCCCAGAAA AATCT | SSLP chr.#5-71.13cM | 207bp | 222bp |
| | AAACTCGAGAGTTTTGTCT AGATC | | | |
| K1881 | GAGAAGATTGAGCATTAGA GCAC | SSLP chr.#5-80.8cM | 208bp | >208bp |
| | CACATCCACAATTCCCTCGA TCG | | | |
| MPO12a (AB006702) | TGCATTTGGTTTGGTAAGC A | SSLP chr.#5- cM | 105bp | 90bp |
| | TGTTTGGAGCTTTGGGTTT C | | | |
| BH517 | GGCGCATATCTTTCCTCAA A | Sequencing chr.#5- cM | 990bp | 990bp |
| | TGGCCCTGTTACAGAAAAC C | | | |
| HD598 | TTGGCTTTTCTTCTCGTCA AA | Sequencing chr.#5- cM | 840bp | 840bp |
| | ATCTCGGAAGACAACGATG G | | | |
| MEE6a (AB010072) | TTCATGGATGTTGCCATG T | SSLP chr.#5- cM | 105bp | 85bp |
| | GCGTGTGTTGTGACCTCTT G | | | |
| MYC6a (AB006707) | ACCTGCTGCGATCATTCTC T | SSLP chr.#5- cM | 111bp | 89bp |
| | AAAAGGGGAAGTGGTCCAA C | | | |
| ciw9 | CAGACGTATCAAATGACAA ATG | SSLP chr.#5-88cM | 165bp | 145bp |
| | GACTACTGCTCAAATATT CGG | | | |
| K994 | ACTCAACCCTAGATGGTGT CG | SSLP chr.#5-94cM | 195bp | >195bp |
| | CGAAGTGCTTTATCTTGTA ACG | | | |

100% 변이형의 화분 표현형을 보이는 32개 F₂ 개체(homozygous *gem3* mutant)로부터 genomic DNA를 추출하여 분석한 결과 최종적으로 MPO12a 마커 위치에서 1개의 재조합개체를 확인하였으며, 반대편의 MEE6a 위치에서 1개의 재조합 개체를 발견하였다(표 3-7). Fine mapping 결과 총 535 F₂ 개체를 분석한 결과 최종적으로 MPO12a 위치에서 5개의 재조합개체를 확인하였으며, 반대편의 MEE6a 위치에서 3개의 재조합 개체, 총 8개의 재조합 개체를 확보하고 있다. 현재 새로운 마커들을 계속 개발해가는 동시에 2개 마커의 중간에 위치하는 1Kb 정도의 genomic DNA단편을 각 재조합개체에서 PCR 증폭을 하여 염기서열 분석을 통하여 재조합 여부를 조사하고 있다.

gem3 변이체의 유전분석 결과로부터 다음과 같은 결론을 획득하였다. *gem3* 변이 음성배우자(화분)들은 극히 일부(10% 이하)만 후대로 유전적 전이되는 음성특이적 배우자적 변이체인 것으로 판명되었다. *gem3* 유전자는 2개의 SSLP 마커-MPO12a 및 MEE6a-사이의 약 240kbp 지역에 존재하는 것으로 최종확인 되었으며, 이 지역은 서로 중첩되는 7개의 BAC-MPO12, K21I16, MNF13, K1B16, MHK7, MMG1, MEE6-으로 구성되어 있으며 75개의 유전자가 존재하고 있다. 이중에는 cytokinesis에 기능을 가질 것으로 추정되는 putative mitogen-activated protein kinase kinase(MAPKK) (At5g40440)이 *gem3* 유전자일 가능성이 높은 편이다. 현재 확보된 8개의 재조합개체를 이용하여 대상지역을 더욱 좁혀 변이유발 유전자를 탐색할 목적으로 고해상도 유전자 정밀지도 작성 연구가 수행하였다.

Table 3–7. Experimental results of *gem3* mapping using homozygous F₂ mutants.

| | Phenotype | Markers | K1881 | MPO12a | MEE6–a | MYC6–a |
|-----|------------|-----------|---------|---------|---------|--------|
| | | Kbp | 13770 | 14990 | 15264 | 15367 |
| | | Fertility | K18L3 | MPO12 | MEE6 | MYC6 |
| Y5 | ND | ND | L | | L | |
| O2 | Big pollen | RF | L | | L | |
| O13 | ND | RF | L | | L | |
| S5 | Big pollen | RF | L | | L | |
| S25 | ND | RF | L | | L | |
| X3 | Big pollen | RF | C/L | L | L | L |
| X4 | Big pollen | RF | L | | L | |
| X24 | Big pollen | RF | Not amp | L | Not amp | |
| X36 | Big pollen | RF | Not amp | Not amp | Not amp | |
| Z18 | Big pollen | RF | L | L | C/L | C/L |
| L24 | Big pollen | RF | L | | L | |
| u14 | Big pollen | RF | L | | L | |
| u24 | Big pollen | RF | L | | L | |
| u27 | Big pollen | RF | C/L | L | L | L |
| u31 | Big pollen | RF | Not amp | L | L | |
| R22 | Big pollen | RF | L | | L | |
| R31 | Big pollen | RF | L | | L | |
| W18 | Big pollen | RF | L | | L | |
| P6 | Big pollen | RF | L | | L | |
| F17 | Big pollen | RF | L | | L | |
| F37 | Big pollen | RF | L | | L | |
| G6 | Big pollen | RF | Not amp | L | L | |
| G26 | Big pollen | RF | L | | L | |
| G36 | Big pollen | RF | L | | L | |
| T13 | Big pollen | RF | C/L | C/L | L | L |
| T16 | Big pollen | RF | L | | L | |
| T37 | Big pollen | RF | L | | L | |
| V2 | Big pollen | RF | L | | L | |
| V17 | Big pollen | RF | L | | L | |
| V39 | Big pollen | RF | C/L | L | L | L |
| V5 | Big pollen | RF | L | | L | |
| V19 | Big pollen | ND | L | | L | |

라. sidecar pollen 변이체의 유전분석 결과

1) *scp* 유전분석결과

1). *scp* mapping 기본집단의 조성

scp 변이체는 이미 1996년에 보고된바 있는 화분발달과정에서 비정상적 세포분열 현상을 나타내는 웅성 배우자적 변이체이다(Development 122:3243). *scp*변이 화분의 발달상 특성은 화분 제1 세포분열 이전 소포자가 비정상적으로 분열하여 2개의 세포를 형성한 후, 이들 중 한 세포는 정상적인 제1, 제2 세포분열을 거쳐 성숙한 형태의 화분으로 발전하는 데 비해 다른 세포는 발달이 멈추어 지는 매우 특이한 세포분열에 관련된 변이형을 보인다. 본 연구팀에서 이 변이체가 식물의 화분 발달과정을 이해하는데 연구적 가치가 매우 크며, 또한 웅성 배우자 특이적인 변이체이므로 인위적 불임유발을 위해 유전자의 promoter를 활용할 수 있다고 판단하였다. 따라서 본 세부과제 책임자는 2년차 연구를 착수하는 시점에 UC Berkeley의 Dr. S. McCormick와 접촉하여, UC Berkeley의 연구팀들이 내부 사정에 의해 *scp*유전자에 관한 연구를 이미 중단하였으며, 계속 수행할 의사가 없다는 것을 확인하고 본 연구팀에서 *scp*유전자를 분리할 목적으로 변이체의 종자를 분양받아 F₂ mapping 기본집단을 양성하였다.

scp fine mapping을 위하여 Arabidopsis ecotype Columbia(Col-O)의 화분을 동형접합형의 변이체의 주두에 인공수분하여 수 개의 F₁ 개체들을 생장실 환경에서 키운 후, 화분의 표현형을 관찰하여 F₁의 표현형을 확인한 후 종자를 채종하였다. 2개 F₁ 개체의 종자를 파종하여 총 411개의 F₂ 개체를 전개하였다. 411개의 F₂개체들의 유전적 분리비를 조사한 결과는 변이형과 정상형의 분리비가 64:36 이었다(표 3-8). 이는 정상적인 멘델의 분리비를 보일 경우, 기대되는 75:25와는 차이를 보인다. 이러한 비정상적 유전적 분리현상은 이미 보고된 바와 같이 웅성배우자의 후대로의 불완전 유전적 전이(Incomplete genetic transmission)에 기인하는 것으로 생각된다.

Table 3-8. Segregation analysis of F₂ mapping population of two mutant F₁ plants originated from crosses of homozygous *scp* and Col-O.

| F ₁ Parents | No. <i>scp</i> | No. wild-type | No. tested plants |
|------------------------------|----------------|---------------|-------------------|
| <i>scp</i> F ₁ -1 | 114 | 72 | 186 |
| <i>scp</i> F ₁ -2 | 147 | 78 | 225 |
| Total No. | 261 | 150 | 411 |
| Total % | 63.5% | 36.5% | 100% |

2). Map-based cloning을 위한 *scp* fine mapping

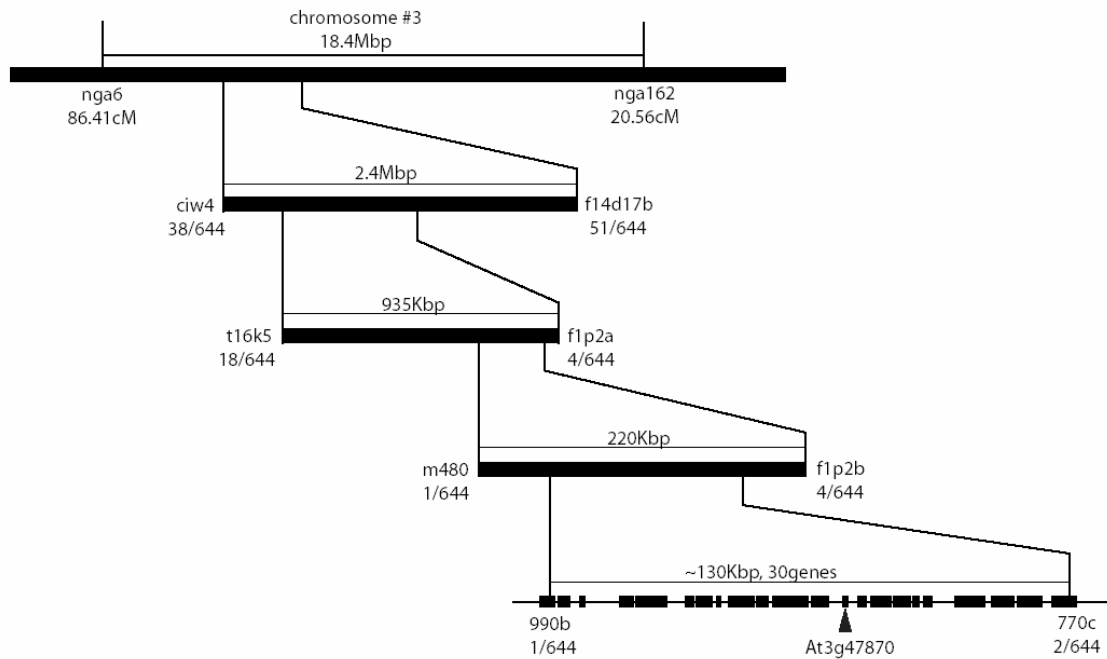
9개의 SSLP marker들을 사용하여 37개의 F₂ 정상형의 개체들을 대상으로 *scp* mapping을 수행하였다. 3번 염색체의 86.41cM에 위치한 nga6 마커로 분석한 결과, Col/No-O type이 16개체, Col/Col type 19개이며 No-O/No-O type은 2개에 지나지 않았다(표 3-8). 이 결과는 nga6 마커와 약한 정도의 연관을 나타내는 것으로, *scp*유전자가 3번 염색체상에 위치함을 강하게 시사하며, 약 27%인 재조합가로 볼 때 마커로부터 25-30cM 떨어져 있는 것으로 예측된다.

Table 3-8. Experimental results of *scp* mapping using F₂ mutants with wild-type pollen.

| Markers | nga162 | GAPAB | F14D17B | ciw4 | RPF24 | RH53 | nga6 |
|--------------------|---------|-------|---------|---------|--------|-------|--------|
| cM | 20.56 | 43.77 | | 72 | | | 86.41 |
| Mb | 4.60Mb | 9.8Mb | 11.05Mb | 19.0Mb | | | 23.0Mb |
| BAC | | | | | F24G16 | F27H5 | |
| F ₂ -Wt | Not amp | | C | C | C/N | C/N | C/N |
| F ₂ -Wt | Not amp | C/N | C | C | C | C | C |
| F ₂ -Wt | N | C/N | C | C | C | C | C |
| F ₂ -Wt | C | | C | C/N | C/N | | C/N |
| F ₂ -Wt | Not amp | C/N | C/N | C | C | C | C |
| F ₂ -Wt | C | | C | C | C/N | | C/N |
| F ₂ -Wt | C/N | C/N | C | C | C | | C |
| F ₂ -Wt | C | | C | C | C | C | C |
| F ₂ -Wt | C/N | | C | C | C/N | C/N | C/N |
| F ₂ -Wt | C | C/N | C | C/N | C/N | | C/N |
| F ₂ -Wt | | C/N | C | C | C | | C |
| F ₂ -Wt | | | C | C | C | C | C |
| F ₂ -Wt | | | C | C/N | N | N | N |
| F ₂ -Wt | | C/N | C/N | C/N | C/N | | C/N |
| F ₂ -Wt | | C/N | C | C | C | C | C |
| F ₂ -Wt | | | C | C/N | C/N | | C/N |
| F ₂ -Wt | | C/N | C/N | C | | | C/N |
| F ₂ -Wt | | | C | C | | | C |
| F ₂ -Wt | | | C | C | | | C |
| F ₂ -Wt | | | C | C | | | N |
| F ₂ -Wt | | N | N | C | | | C |
| F ₂ -Wt | | C | C | C | | | C |
| F ₂ -Wt | | N | C | C | | | C |
| F ₂ -Wt | | C | C | C | | | C/N |
| F ₂ -Wt | | N | Not amp | C/N | | | C/N |
| F ₂ -Wt | | C/N | C | C | | | C |
| F ₂ -Wt | | C | Not amp | Not amp | | | C |
| F ₂ -Wt | | C | C | N | | | C/N |
| F ₂ -Wt | | C/N | C | C | | | C |
| F ₂ -Wt | | C | C | Not amp | | | - |
| F ₂ -Wt | | C | C | C | | | C/N |
| F ₂ -Wt | | C/N | C | C | | | C/N |
| F ₂ -Wt | | C/N | C | C | | | C/N |
| F ₂ -Wt | | C/N | C | C | | | C |
| F ₂ -Wt | | C/N | C | C/N | | | C/N |
| F ₂ -Wt | | C | C | C | | | C |
| F ₂ -Wt | | C/N | C/N | Not amp | | | C/N |
| F ₂ -Wt | | C | C | C | | | C |

3번 염색체의 40-70cM 지역에 위치하는 SSLP marker 6개를 고안하여 *scp* mapping 작업을 계속 수행한 결과, 지금까지 *scp* 변이유전자의 위치에 관해 대략의 지역을 확보하고 이상의 마커들을 이용하여 411개의 F₂ mapping 집단에서 재조합현상을 보이는 개체를 탐색하고 있다.

현재까지의 mapping연구결과 scp변이전자는 3번 염색체의 16.4Mb-18.9Mb의 약 2,500kbp 지역에 존재하는 것으로 확인되었다. 최종적으로 이미 형성된 여러 변이체의 F₂ mapping 기본 집단을 이용한 mapping이 마무리단계에 이르러 30개의 유전자의 범위로 좁아졌으며, 이들 후보 유전자들의 염기서열을 분석함과 동시에 T-DNA 삽입형 변이체들을 Arabidopsis seed stock centre로부터 분양받아 그 pollen phenotype을 조사하는 연구를 병행하였다.



```

ATGAGCAATA CAAACACAT CCACAAAGGG TTACTAGAGA GGCTTTTAGA TCTTCTCTTG ATCGCTCTTA
TAGTTTACAT GACTCTTAAA GGCGGCACGA GTGGGGCTTG TGCCGCGTGC AAGTACCAAC GTAGACGCTG
CGCCGCGGAC TGCCCCCTCG CGCCTTACTT CCCAGCCGAA CAACCGAAAC TTTTCCAAA CGTTCACAGG
CTATTCGGCG TAAGAAGTAT CGTCAAGATC CTCGAAAAAC TAGACGAAAC TCAGAAACCA GAAGCAATGA
AATCAATCAT CTCCAGTCT TATGTCCGTG ACCGTTCTCC TGTCCACGGT TGCCTCGGCG TCACGCAACA
ACTTCAATAC ATGATCTGGT TTGCTGAAGA AGAACTCAA GCTGTCAATT CTCAATTACA ACTATATCGC
TCTCAACCAC AAAACGGTCA AAATCAAAC CAAAACCATA ATCCTAATCA GATGATTCAT GAGCTTG GTA
GTGATCATAA TAAGCAGCAA GAAGATGTTA CATCGCAGCA GCTTGATTTG GGTATGGGAC TTAACGTTAA
CAATAATCAG AGCAATGTCG TTACACCATT CTTTAGTTCA TTATTACCAG TTTCCGAAAC ACAACAGCCA
CAAATGTCTT ACAC TTATAG CTGCAGTGAG GTTAACAACA ATGGCTATAG TCCTCCTGCT TATAATACAG
ATTCGGGCAA GGAGATTCTG ACCAACAATA ACAATGTTTG GGGTGATCAG AATCGATTTT TGTATAACAA
CAACAATGGA G----- -GAGAGTTGT CATGAGATGA AGAGTAACGG TGTAAATGGCA
ATACAATCAC AGCTCGTAAA TCTGCAAATG GTATCAAATC ATCAGCGAGT GGAAGAAGAA GAAGCTGATC
ATGAATACGA TGAACTCCAT CAGTTTCTTG ATATCATTGA CGATAGGCAA TCATTTGGGG ATTCTAAAGA
AGCGTACGCC TCAAGGTAG

```

Figure 3-10. Map-based cloning of *SCP* gene. The *scp* locus was localized to a region of ~130Kb containing 30 genes in the BACs T23J7 and T17F15 on chromosome 3. Sequencing some of candidates and screening the pollen phenotypes of T-DNA insertion lines in the region led to the identification of *SCP* gene, At3g47870.

(참고: sidecar pollen gene (At3g47970)의 구조. 2번째 exon 중간부위에 20bp deletion이 일어나 deletion 종료지점으로부터 10bp 이후 stop codon이 나타남을 보여주고 있다)

마. *sidecar pollen* 유전자 분리 및 유전자 기능분석

1) *SCP* 유전자 분리 확인

*scp*변이체내의 30개 후보 유전자 가운데, At3g47870의 염기서열에서 발견된 20bp의 deletion이 *scp*변이체의 화분표현형과 co-segregation 함을 확인하였고, T-DNA삽입형변이체인 SALK_019070에서 *scp*변이체와 동일한 화분표현형을 확인함으로써 *SCP*유전자가 At3g47870임을 확인하였다(그림 3-11). 이에 따라, 본연구팀이 보유한 두 *scp* 변이체를 *scp-1* (No-0 background) 과 *scp-2*(Col-0 background)로 명명하기로 하였다.

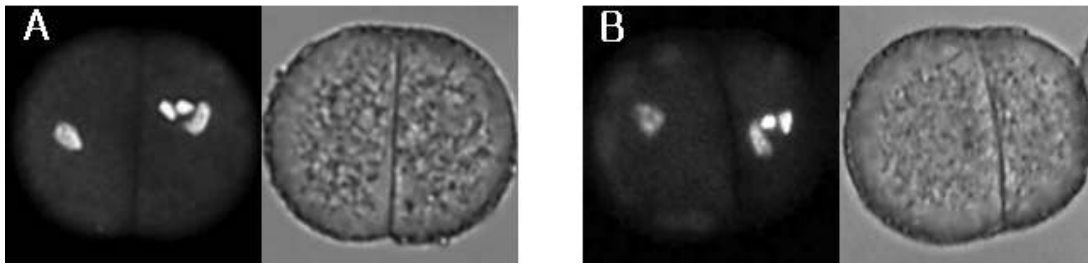


그림 3-11. DAPI염색후 UV-epifluorescence로 (왼쪽) 혹은 bright field로 (오른쪽) 관찰한 화분의 표현형. A. *scp-1* B. *scp-2*

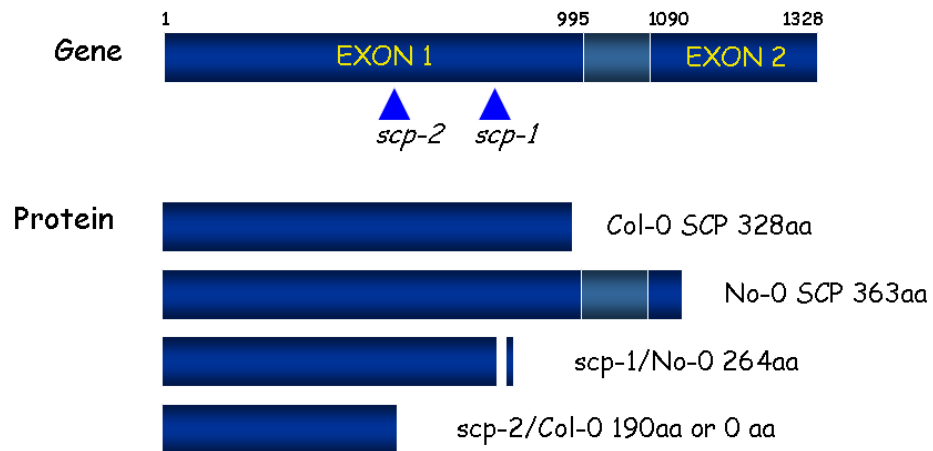


Figure 3-12. Structures of *SCP* gene and protein. Positions of genetic lesion in *scp-1* and *scp-2* are indicated in triangles and deduced coding regions are shown beneath.

*SCP*유전자는 LOB (Lateral Organ Boundary) domain을 포함하는 LBD family에 속하며, 328aa (Col-0)-363aa (No-0)를 암호화하고 있는 유전자이다. 그림 3-12는 Wt *SCP* 유전자와 두 변이체인 *scp-1*과 *scp-2*의 유전자와 단백질 비교를 보여주고 있다.

2) RT-PCR에 따른 *SCP*유전자의 발현양상조사

유전자의 발현양상을 조사하기 위하여, RT-PCR 분석에서 *SCP*유전자는 대부분의 체세포

조직에서는 발현하지 않고, 어린 floral bud에서 강하게 발현하고 개화한 후 다시 줄어드는 양상을 보였다 (그림 3-13). 이 결과와 *scp*변이체의 표현형이 나타나기 시작하는 시점을 바탕으로 *SCP*유전자는 비대칭 분열이 일어나는 microspore에서 특이적으로 발현하는 유전자로 추측된다.

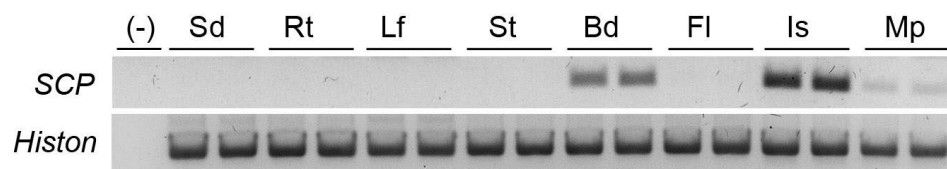
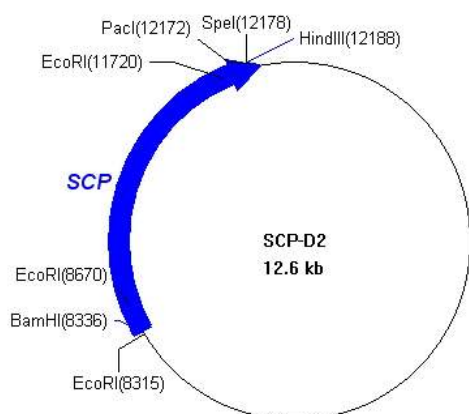


Figure 3-13. RT-PCR analysis of SCP expression in wild type RNA samples from one week old seedling (Sd), root (Rt), leaf (Lf), stem (St), flower (Fl), immature spores (Is), or mature pollen (Mp). Negative control for RT-PCR reaction was done without reverse transcriptase (-). *Histon* gene was used as a positive control for integrity and equal amount of RNA samples used.

3) *SCP* complementation 분석.

*SCP*유전자가 *scp*변이체의 표현형을 정상으로 회복시킬 수 있는가를 증명하기 위하여 1.7Kb promoter와 0.7Kb 3'말단을 포함하는 3.7Kb의 *SCP*유전자를 클로닝하여, *scp-1* 변이체를 형질전환하였다. 형질전환체를 선발한 후 *scp-1*의 유전자형 (wt, heterozygous *scp-1*, homozygous *scp-1*) 을 먼저 조사하고, 각각의 화분의 표현형을 조사한 결과 예상한 바와 같이, 3.7Kb의 *SCP*유전자는 *scp*변이체의 화분표현형을 정상으로 회복시킬 수 있다는 것을 아래와 같이 확인하였다. 그림 3-14의 그림과 표는 complementation 실험에 사용한 벡터와 그 결과의 요약이다.



| Transformants | Genotype | % <i>scp</i> pollen |
|---------------|-----------------|---------------------|
| D2-A1 | Wt | - |
| D2-A2 | Wt | - |
| D2-B1 | <i>scp-1 ht</i> | 3.0 |
| D2-B2 | <i>scp-1 ht</i> | 9.5 |
| D2-C1 | Wt | - |
| D2-C2 | <i>scp-1 ht</i> | 8.2 |
| D2-D1 | Wt | - |
| D2-D2 | Wt | - |
| D2-E1 | <i>scp-1 hm</i> | 20.7 |
| D2-E2 | <i>scp-1 ht</i> | 9.6 |
| Control-1 | <i>scp-1 ht</i> | 18.2 |
| Control-2 | <i>scp-1 hm</i> | 62.4 |

Figure 3-14. Complementation analysis. The vector containing a 3.7Kb fragment of *SCP* genomic region (left) was introduced into *scp-1* mutant plants and resulted reduced frequencies of *scp* mutant pollen (right).

4) *SCP* promoter활성조사.

위에서 언급된 RT-PCR실험에서 *SCP* 유전자의 발현이 조사되었으나, 보다 자세한 발현 양상과 시기를 확인하기 위하여 각각 1.6Kb 와 1.0Kb *SCP* promoter 부위를 Gateway GFP::GUS fusion construct에 도입한 LR-LOBPRO1과 LR-LOBPRO2를 제작하였다. 이 두 construct를 대기장대 Wt Col-0에 형질전환하고, 각각에 대하여 형질전환체를 선발하였다. 아래 그림 3-15에서와 같이, 1.6Kb (A)와 1.0Kb promoter (B) 모두 같은 양상의 GUS발현을 유도하였으며, microspore에서의 GUS발현을 확인할 수 있었다 (C).



Figure 3-15. GUS expression under the control of *SCP* promoter in wild type. GUS assays were carried out using whole inflorescence from SCPPRO1 containing ~1.6kb upstream sequence (A) or SCPPRO2 ~1.0Kb (B).GUS staining was confined inside anther locule and detected from microspore stage (C, left), which was determined by DAPI counter-staining (C, right).

5) *SCP* protein의 subcellular localisation

화분 세포의 발달과정중 *SCP* protein의 세포내의 위치를 확인하기 위하여 1.6Kb *SCP* promoter와 *SCP* 단백질을 암호화하고 있는 1Kb부위를 GFP(Green Fluorescence Protein) 혹은 RFP(Red Fluorescence Protein) 염기서열의 앞부분에 삽입함으로써 pSCP-SCP-GFP 와 pSCP-SCP-RFP 벡터를 제작하였다(그림 3-16).

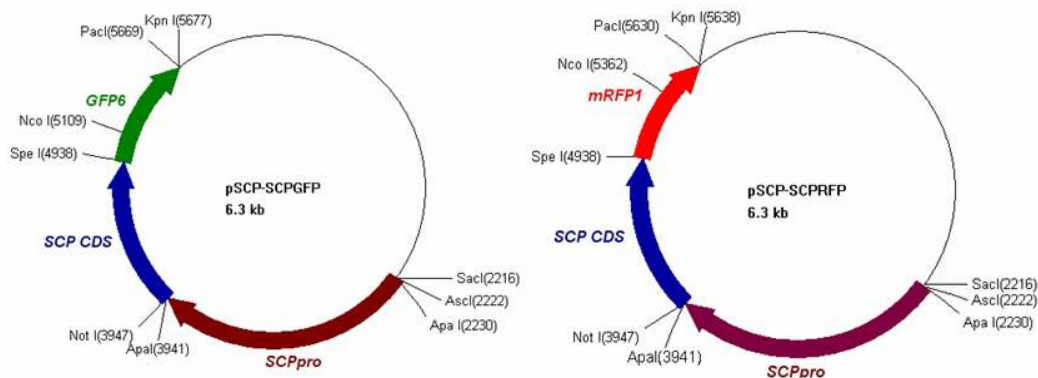


Figure 3-16. Maps of vectors used to localise *SCP* protein in live pollen. pSCP-SCP-GFP(left) and pSCP-SCP-RFP(right).

애기장대 Wt Col-0 에 도입한 후 각각에 대하여 형질전환체를 선발하였다. 개화시기의 형질전환체를 G/RFP 필터를 장착한 UV 형광현미경에서 조사한 결과 SCP protein은 그림 3-13에 해당하는 micropore시기의 핵에서 발현함을 확인하였다(그림 3-18).

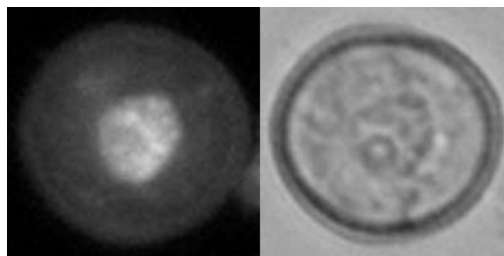


Figure 3-18. Sub-cellular localization of the SCP::GFP6 protein fusion under the control of the *SCP* promoter in wild type. Immature spores were dissected out to be viewed with GFP filter under epi-fluorescence (left) or bright field (right). The GFP6 fluorescence of the reporter is concentrated in the nucleus at microspore stage.

6) *scp*변이화분의 발달과정조사

화분 발달과정동안 야생형과 *scp*변이형 화분을 비교조사함으로써 *scp*변이가 화분발달에 미치는 영향에 대해 보다 구체적인 단서를 확보하기 위하여 1세포시기인 소포자에서 최종성숙화분시기까지 그 대표적인 시기를 DAPI염색을 통하여 고찰하였다(그림 3-19). 야생형의 경우 감수분열직후 초기 소포자(그림 3-19A)의 핵이 한쪽으로 이동하는 세포극화현상을 보인다 (그림 3-19B). 이후 비대칭적 위치에서 제1화분세포분열이 일어나 DAPI에 의해 작고 진하게 염색되는 생식세포와 크고 연하게 염색되는 영양세포로 구성된 초기 2세포화분이 된다(그림 3-19C). 이후 칼로스로 이루어진 생식세포벽이 분해되면서 생식세포가 영양세포내로 잠식됨과 병행하여 생식핵의 DNA양이 증가하고 모양이 변하는 2세포 중기, 후기를 거친다(그림 3-19D-E). 생식세포가 제2화분세포분열을 거쳐 두 개의 정자세포를 형성함으로써 3세포시기 화분(그림 3-19F)이 형성되고 최종적으로 성숙화분이 된다 (그림 3-19G). *scp* 변이형 화분의 경우 극성화된 소포자시기까지는 야생형과 동일한 발생양상을 나타내었으나 이후 제1화분세포분열 시기를 시점으로 변형체가 나타났다 (그림 3-19H-M). 제1화분세포분열이 야생형에 비해 대체로 지연되어 일어나며, 이후 일부는 야생형에 비해 비교적 크기가 큰 초기2세포화분(그림 3-19H)로 발달하거나, 일부는 핵분열이 야생형의 경우로부터 매우 벗어난 방향으로 일어남으로써 2핵세포에 가까운 화분이 생성 (그림 3-19I-그림 3-19L)되기도 하며, 보다 변이정도가 심한 *scp-2*의 경우에는 제1 화분세포분열이 일어나지 않는 경우도 발견된다 (그림 3-19M). 이러한 고찰의 결과, *scp*변이가 세포극성화에는 영향을 주지 않고, 이후 제1세포분열을 저해하며 세포분열의 방향성을 바꾼다는 것을 알게 되었다. 이 결과는 McCormick교수진이 초기 1996년 논문에서 제시한 한가지 가설중 SCP가 제1세포분열의 억제자일 것이라는 가능성을 배제 할 수 있도록 한 중요한 결과이다.

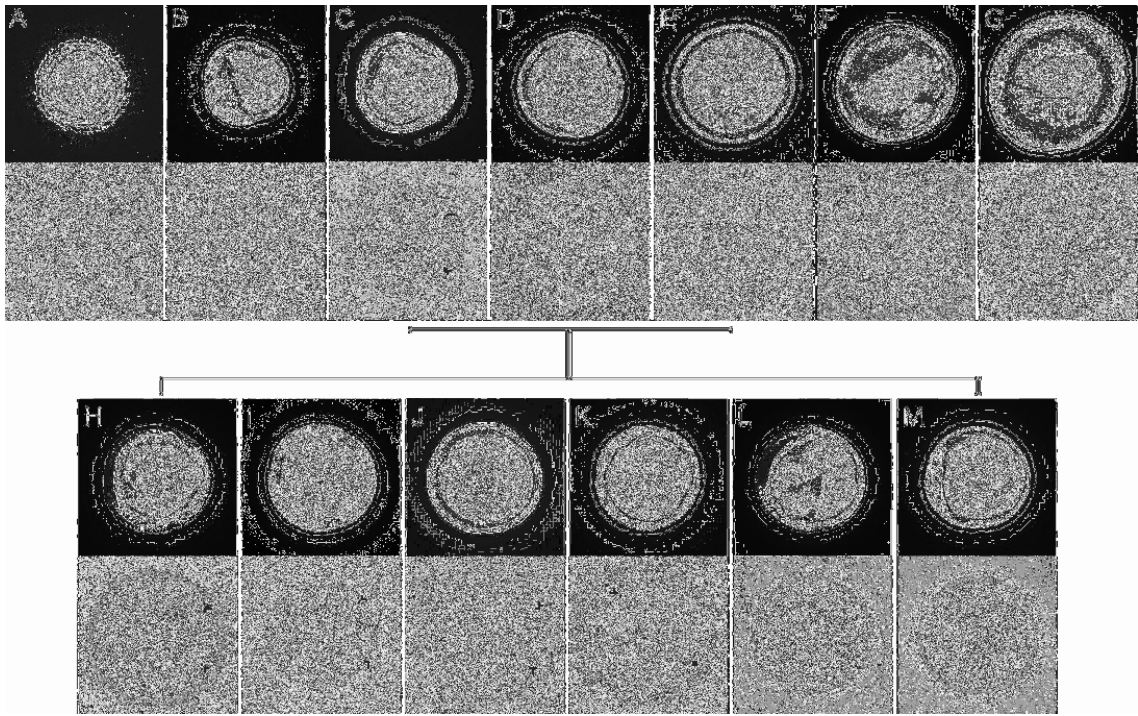


Figure 3-19. Pollen development and mitotic defects in *scp*mutants. DAPI-stained microspores and mature pollen in wild type (A-G) and mutant spores (H-M) observed when wild type spores are at bicellular stage (C-E). (A) early microspore, (B) polarized microspore, (C) early bicellular, (D) mid bicellular, (E) late bicellular, (F) tricellular, (G) mature pollen stages. (H-L) mutant spores in *scp-1*. (H) bicellular pollen with bigger size, (I-L) pollen with two equal nuclei, which are either separated in different cellular compartment or in the same cytoplasm. (M) uninucleate arrested at polarized microspore stage, which are additionally found in *scp-2* mutant. Bar=10um.

7) *scp*변이형 화분의 유사분열 방향성조사

*scp*변이형 화분에서 제1세포분열의 핵분열 방향성이 야생형으로부터 벗어나 있는지를 더 자세하게 알아보기 위하여 유사분열중인 화분세포들을 비교하였다. 실지로 야생형의 경우 유사분열의 중기-말기에 있는 모든 화분세포가 일정한 방향 (그림 3-20A와 3-20C)으로 관찰되는 것에 비해 *scp*변이체의 경우 그 방향이 심각하게 벗어난 세포들 (그림3-20B와 3-20D)도 목격되었다. 따라서, 이는 SCP 단백질이 없을 경우 제1화분세포 분열이 저해되고 그 방향성에 심각한 장애가 생길 수 있다는 것을 다시 한번 뒷받침 해 준 결과라고 할 수 있다.

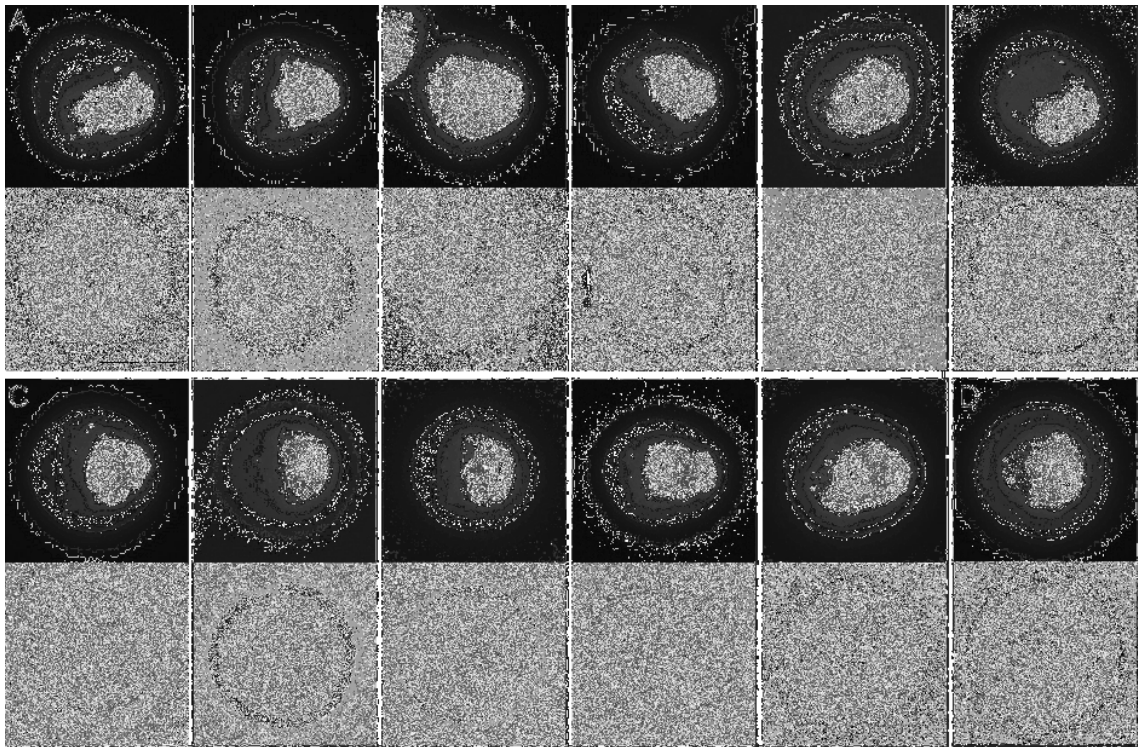


Figure 3-20. Chromosome alignments at pollen mitosis in wild type and scp mutants. Aligned chromosomes at pollen mitosis I were viewed after DAPI staining in wild type (A,C) and mutants (B,D) through polar axis (A,B) or radial wall (C,D). Bar=10um.

바. *sidecar pollen* 유전자의 yeast two hybrid 분석결과

1) 발생단계별 화분세포의 분리와 yeast two hybrid cDNA library construction

전년도 수행한 연구결과에 의하면 SCP단백질은 대부분의 식물기관에서는 발현하지 않고 화분발달 과정중 특이적으로 요구되며, 2세포시기가 되기 전후 그 기능이 요구되는 것으로 추정된다. 따라서 SCP단백질과 상호작용하는 단백질의 유전자를 분리하기 위하여는 화분세포 내에서 1세포시기와 2세포시기의 화분세포들이 농축된 시료로부터 cDNA library가 제작될 필요가 있다. 이를 위하여 대략 2000개체의 애기장대로부터 개화전 꽃 봉우리 시료를 모으고 이로부터 전체 화분세포집단을 먼저 확보한 뒤, Percoll을 이용한 size-fractionation 방법으로 특정 시기의 화분세포들이 상대적으로 농축된 부분시료들을 분리하였다. 이렇게 얻어진 미성숙화분세포 농축 시료로부터 total RNA를 분리하고 Matchmaker two hybrid system (Clontech)을 이용하여 cDNA를 합성하였다.

2) SCP 베이트 벡터 제작 및 yeast two hybrid screening

우선 SCP 전체 단백질에 해당하는 cDNA부위를 GAL4의 DNA-binding domain (DBD)에 붙여 베이트 벡터를 제작하고, 이 베이트 벡터가 library 스크린에 적합한지를 먼저 검증하였다. 이는 Matchmaker two hybrid system이 yeast내에서 SCP베이트가 상호결합하는 프레이(prey)단백질을 만나면 Histidine과 Adenine 결핍배지(-HLT, -AHLT배지)에서도 자랄 수 있는 성질을 이용하여 결합단백질을 선별하며, 따라서 이 SCP 베이트 단독으로도 -HLT와 -AHLT에서 자라는 자가활성을 보이거나, yeast의 생장에 독성을 나타낼 경우에는 스크

린에 적합하지 않기 때문이다. 이러한 자가활성과 독성에 대한 검증을 통하여 SCP 베이트 균주가 3-5mM 3AT를 첨가한 -HLT배지에서 자가활성이 효과적으로 억제되고, 또한 정상적으로 성장한다는 것을 확인하였다. 이후 AH109 yeast 호스트균주에 미성숙화분세포 cDNA와 SCP베이트 그리고 library를 합성하는 prey 벡터를 모두 함께 co-transformation함으로써 cDNA 라이브러리제작과 동시에 스크린을 수행하였다.

3) 양성반응단백질(positive interactor)의 분리

대략 3×10^5 개의 co-transformed yeast colony를 3-5mM 3AT가 포함된 -HLT plate에서 스크린 한 결과 1차적으로 양성반응을 보이는 465개의 균주를 확보하였다. 이후 이 1차 양성반응균주들을 대상으로 한 2차테스트에서 -AHLT plate에서도 자라는 정도(그림 3-21 오른쪽)와 alpha-galactosidase 활성도를 조사(그림 3-21 왼쪽)하여 그 양성반응 정도에 따라 3개의 그룹으로 나누지는 65개의 균주를 선별하였다. 이 가운데 1,2차테스트에서 모두 양성반응 정도가 높게 나타난 1,2 그룹을 대상으로 각각 plasmid를 분리하고, AH109 호스트 내에서 SCP베이트와의 결합을 재조사하는 3차 검증(그림 3-22)을 통과한 클론은 최종 DNA 염기서열을 분석하였다.

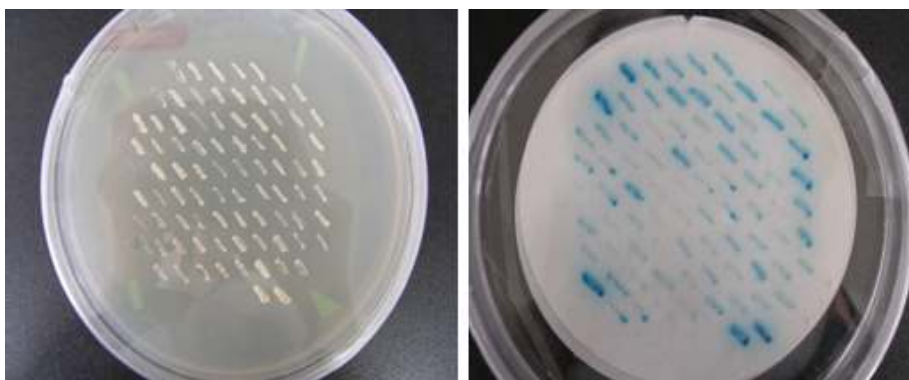


그림 3-21. 3AT가 포함된 -HLT배지에서 라이브러리 스크린을 통하여 양성반응을 보이는 클론들을 1차적으로 분리하였고, 이 클론들을 대상으로 -AHLT 배지에서 자라는 정도(그림 오른쪽)와 alpha-galactosidase 활성도정도를 조사(그림 왼쪽) 하는 2차검증을 실시하였다.

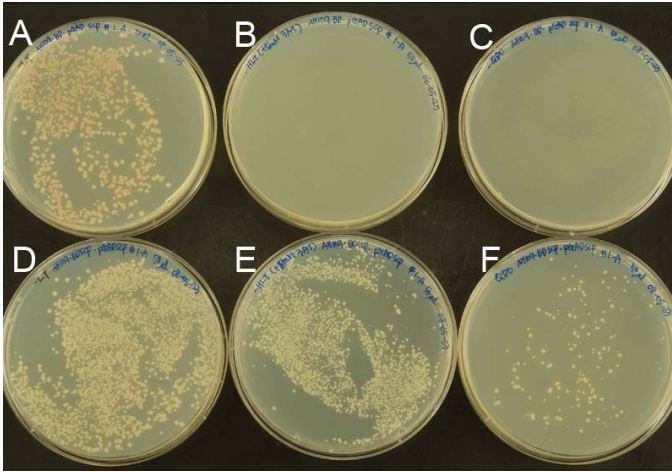


그림 3-22. 2차테스트를 통과한 65개의 클론들을 그 양성반응정도에 따라 3개의 그룹으로 나누고 이들중 1, 2 그룹에 해당하는 클론들을 대상으로 plasmid를 분리하고 AH109에서 SCP베이트와 결합여부를 재 검증하였다. 위는 그 중 한 예를 보여주는 그림이다. 벡터컨트롤 (A-C) 혹은 SCP베이트를 스크린에서 얻은 한 클론과 함께 yeast내로 재도입하여 -LT, 3AT를 포함한 -HLT, 그리고 -AHLT 배지에서 배양한 실험이다. 이 클론은 E와 F에서 확연하게 자라는 양성반응을 보였다.

이러한 과정을 거쳐 최종적으로 19개 클론의 염기서열을 분석하였으며(표 3-9), 이 가운데 GRF3 와 protein kinase는 각각 두 번씩 검출되는 것을 볼 수 있었다.

표 3-9. 3차테스트를 거쳐 최종 분리된 19개의 양성반응클론들의 유전자 서열 분석결과.

| Group | Plasmid | Gene ID |
|-------|----------|--|
| 1 | scp1-a | AT5G38480,GRF3 protein |
| 1 | scp65-a | AT2G17200, UBQ protein |
| 1 | scp413-a | AT4G37990, ELI3-2(ELICITOR-ACTIVATED GENE 3) |
| 1 | scp125-c | AT1G64630, protein kinase family protein |
| 1 | scp279-a | AT3G22470, pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein |
| 1 | scp339-d | AT3G16090, zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein |
| 1 | scp469-a | AT1G64630, protein kinase family protein |
| 2 | scp10-a | AT5G28750, Tha4 protein |
| 2 | scp21-a | AT5G38480, GRF3 protein |
| 2 | scp23-a | AT1G20140, ASK4(SKIP1-like UBQ protein) |
| 2 | scp29-a | AT2G21390, coatomer protein |
| 2 | scp31-b | AT5G17920, ATCIMS(cobalamin-independent methionine synthase) |
| 2 | scp34-d | AT4G37990, ELI3-2(ELICITOR-ACTIVATED GENE 3) |
| 2 | scp37-a | AT5G66570, Oxygen-evolving complex (OEC) in photosystem II |
| 2 | scp2-c | no result |
| 2 | scp149-a | AT2G28910,CXIP4 (CAX INTERACTING PROTEIN 4) |
| 2 | scp165-a | AT1G03920,protein kinase |
| 2 | scp210-a | AT1G24510,T-complex chaperonin protein |
| 2 | scp260-a | AT5G56010,heat shock protein 90 |

이 결과를 바탕으로 SCP단백질의 결합단백질로서 보다 강력한 후보가 되는 GRF3(General Regulation Factor 3) 와 protein kinase에 대해 이후의 실험을 수행하고 있다. 이 중 *in silico* data에 의하면 protein kinase는 화분세포 발달시기 중 후기인 3세포시기와 최종 성숙화분에서 그 유전자 발현이 매우 증가되는 것을 볼 수 있는데 비하여, *GRF3*는 그 반대로 SCP 유전자의 경우와 같이 3세포시기 이후에는 급감하는 것을 보여 더 관심의 대상이 되고 있다. GRF3는 모든 진핵생물에서 발견되며 general regulator라는 그 이름에서도 알 수 있듯이 신호전달기작, 세포주기조절뿐만 아니라 세포사멸기작에 이르기 까지 매우 다양한 생체기작에 관여하고 있으며 14-3-3이라고 불리는 family로 분류하기도 한다. *scp* 변이형 화분세포에서 제1화분세포분열의 비대칭성이 야생형에 비해 심각하게 변형되어 있다는 이전의 연구결과(그림 3-19과 그림 3-20 참조)는 SCP가 비대칭분열의 방향성을 조절할 것이라는 것을 시사했다. 이러한 관점에서 볼때, 초파리(*Drosophilla*)와 선충(*C. elegans*)의 비대칭분열을 결정짓는 기작으로 잘 연구되어있는 PAR pathway의 한 구성인자가 14-3-3 유전자라는 점은 SCP의 생체 내 기능을 추측하는 데 있어 고무할 만한 단서이라고도 할 수 있다. 한편, 애기장대 지놈 상에는 13개의 GRF 유전자들이 14-3-3 family를 구성하고 있으며 모든 멤버들은 구조와 아미노산 서열에서 매우 높은 정도의 유사성을 나타내고 있다. 이 가운데 GRF3는 특히 GRF5와 GRF7에 대하여 가장 가까운 유사성을 보인다(그림 3-23).

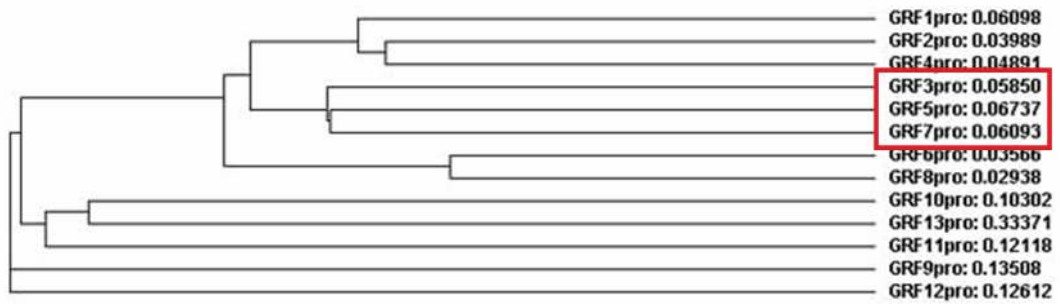


그림 3-23. Phylogenetic analysis of GRFs. Protein sequences were compared using ClustalW program with default settings.

또한 이 세 멤버를 포함한 많은 멤버들이 화분발생과정 동안 발현하고 있는 것을 알 수 있다 (표 3-10).

표 3-10. Expression profiles of GRFs at four typical pollen stages in Arabidopsis (Arabidopsis Gene Family profiler, <http://arabidopsisgfp.ueb.cas.cz>)

| Gene name | Gene ID | | Ms | Bc | Tc | Mp |
|-------------|------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| GRF1 | At4g09000 | 267aa | – | – | – | – |
| GRF2 | At1g78300 | 259aa | 1897 | 2195 | 4009 | 4032 |
| GRF3 | At5g38480 | 254aa | 2300 | 2797 | 3267 | 957 |
| GRF4 | At1g35160 | 267aa | – | – | – | – |
| GRF5 | At5g16050 | 268aa | 855 | 815 | 1719 | 1130 |
| GRF6 | At5g10450 | 246aa | 977 | 827 | 0 | 0 |
| GRF7 | At3g02520 | 265aa | 1635 | 1608 | 1145 | 716 |
| GRF8 | At5g65430 | 246aa | 732 | 557 | 0 | 0 |
| GRF9 | At2g42590 | 276aa | 572 | 799 | 680 | 0 |
| GRF10 | At1g22300 | 251aa | 2429 | 2497 | 3455 | 1760 |
| GRF11 | At1g34760 | 252aa | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GRF12 | At1g26480 | 268aa | 0 | 941 | 3362 | 2278 |
| GRF13 | At1g78220 | 245aa | 0 | 0 | 0 | 0 |

사. *sidecar pollen* 유전자에 관하여 현재 수행중인 연구 및 결론

현재 SCP의 주요 양성결합자들에 대하여 T-DNA 삽입형변이 식물체들을 분석하고 있다. 위에서 기술된 그림3과 표2의 사실을 바탕으로 유추하여 볼때, GRF 멤버들간에 기능적 중복성(functional redundancy)이 있을 가능성이 크며 이로 인하여 *GRF3* 유전자의 단독변이체가 정상적인 발생과정을 보일 가능성 또한 크다고 할 수 있다. 이에 대한 실험적 근거로서 *GRF5*과 *GRF7*을 각각 *GRF3*와 동종의 prey백터에 클로닝하여 SCP베이트 백터와 함께 yeast내에 도입한 결과 이들도 yeast 내에서 SCP와 결합하는 것을 알 수 있었다. 아래의 그림 4는 예시로서 *GRF3*과 *GRF5*에 대한 결과를 보여준다.

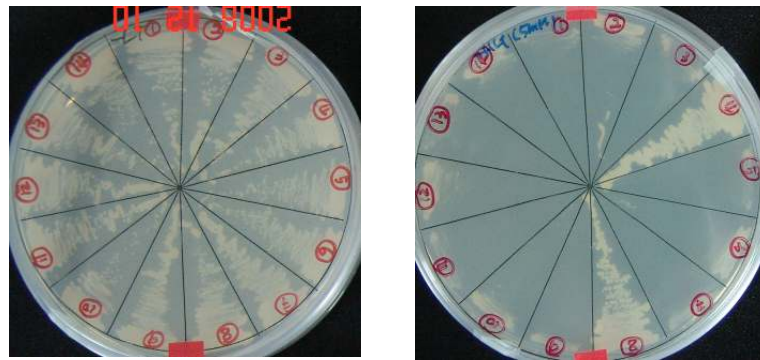


Figure 3-24. Two hybrid interactions of SCP with *GRF3* and *GRF5*. Yeast cells were streaked on -LT (left) and -HLT media supplemented with 5mM 3AT(right). Two sectors with positive growth on -HLT plate with 5mM 3AT indicate the presence of positive interactions between SCP and either *GRF3* or *GRF5*.

현재 *GRF3*와 가장 유사성을 보이는 *GRF5*와 *GRF7*에 대한 T-DNA 삽입형변이 식물체들도 분리하고 있으며, 이 세 멤버들간의 다중변이체들의 확보한 후 화분발생과정을 고찰할 예정이다. 한편, yeasttpvhs0에서 확인된 단백질간 결합반응이 실제로 식물세포에서도 일어나는가를 확인 하기 위하여, BiFC (Bimolecular Florecence Complementation)실험을 준비 중에 있다.

현재 진행중인 이와 같은 실험들을 토대로 ‘실제 화분세포가 분열하는 과정에서 GRF들이 SCP와 결합하는가?’ 혹은 ‘그렇다면 이들의 작용기작은 어떠한가?’와 같은 물음에 답할 수 있을 것으로 기대한다.

비대칭성분열은 모든 다세포 진핵생물이 특화된 세포와 기관들로 분화 발생하기 위해 채택한 가장 핵심적인 조절기작이라고 할 수 있다. 세포벽으로 둘러싸여있는 식물세포들의 경우에도 이러한 비대칭적 세포분열을 통하여 인접한 딸세포들의 운명을 결정한다. 제1화분세포분열의 경우 이러한 조절메카니즘이 가장 극적으로 채택되고 있는 경우라고 할 수 있다. 이는 제1 화분세포분열이 비대칭적으로 일어남으로써 비로서 영양세포와 생식세포라는 두 세포계보가 형성되기 때문이다. 이는 비대칭성을 원심력이나 화학물질을 이용하여 인위적으로 파괴할 경우 화분세포의 생식세포계보가 형성되지 않으며 동시에 중복수정에 참여하는

정자세포를 생산 할 수 없게 된다는 연구사례들에서도 그 중요성이 증명되었던 바이다. 따라서 이 비대칭적 세포분열이 어떻게 조절되는가에 다음세대의 존속 여부가 결정되는 것이다. *scp*변이체는 화분세포에서 이러한 생체조절 메카니즘을 조절하는 데에 화분세포 특이적인 유전자가 있다는 것을 증명하는 현재까지 알려진 유일한 증거이므로, 이 과제를 수행함으로써 SCP유전자를 클로닝한 것에 일차적으로 가장 큰 연구의 의미를 부여할 수 있다. 나아가 SCP단백질과 결합하는 단백질에 대한 유전자들도 분리함으로써, SCP단백질이 비대칭적 세포분열을 조절하는 분자기작도 밝힐 수 있을 것으로 기대한다.

아. *gemini pollen3* 유전자의 map-based cloning

이전의 연구를 통하여 *gem3* 유전자가 존재하는 것으로 밝혀진 294Kb 지역은 knock-out 삽입계통을 분양받아 분석하기에 매우 넓은 지역이므로 고밀도 유전자 지도를 작성하여 지역을 좀 더 좁힐 필요가 있었다. 이를 위하여 3종의 SSLP marker와 2종의 CAPS marker를 제작하여 실험을 수행한 결과 매우 흥미로운 사실을 발견하였다. 제작한 대부분의 marker로 분석한 결과, mapping 기본집단중 정상형의 개체들은 모두 Col/Ler 유전자형, *gem3* 이형접합체 및 동형접합체는 모두 Col/Col 유전자형을 보였다 (표 3-11). 지금까지의 mapping 실험결과의 해석상 이해가 불가능한 현상으로 원인을 규명하기 위하여 다각도로 실험을 진행하였다. Mapping 기본집단이 아닌 Backcross(BC)집단의 개체들을 분석한 결과, 해결의 실마리를 찾을 수 있었다. 이론적으로 BC집단의 경우 변이, 정상의 표현형과 상관없이 분석되는 모든 개체들의 유전자형이 Ler/Ler 형이어야 하나, 분석결과 정상개체들은 Ler/Ler 형, *gem3* 이형접합체는 Col/Ler 형, *gem3* 동형접합체는 Col/Col의 유전자형을 보였다(표 3-12). 이상의 결과는 원래의 *gem3* 변이체에서 변이유전자 존재부위에 Col에서 유래된 DNA 단편이 삽입되었으며, 이로 인해 변이가 유발되었다고 유추할 수 있다. 이 DNA단편은 최소한 200Kb 이상 인 것으로 추정된다. 이러한 현상은 이미 일부의 애기장대 돌연변이체에서 보고된 바 있으며, 그 원인에 대해서는 아직 밝혀지지 않았다. 본 연구과제는 이러한 유전학적 이상 현상의 원인 및 메카니즘을 규명하는 것이 아니라, *gem3* 유전자를 분리 동정하는 것이므로 연구과제의 목표달성을 위하여 현재까지 mapping 기본집단을 대신할 수 있는 새로운 BC집단을 전개하여, 현재 800여 개체로부터 DNA를 추출하여, 이들 DNA를 대상으로 5개의 marker로 분석하여 *gem3* 유전자 지역을 분석 하였다.

표 3-11. gem3 F1, F2 mapping line들을 대상으로 gem3 지역에서 동정된 SSLP marker로 분석한 표로서 이 지역에 Col 유래한 200Kb 이상의 DNA단편이 삽입되었음을 추정하게 한다.

| Line no. | Pheno type | Origin | chro. #5 SSLP/CAPS markers | | | | | | |
|----------|------------|---------------|----------------------------|---------|------|-----|------|-------|-------|
| | | | MPO12 a | MPO12 b | B517 | M12 | H598 | M1324 | MEE6a |
| 1 | wt | Col X gem3 F1 | C/L | C/L | C/L | C/L | C/L | C/L | C/L |
| 2 | wt | Col X gem3 F1 | C/L | C/L | C/L | C/L | C/L | C/L | C/L |
| 3 | wt | Col X gem3 F1 | C/L | C/L | C/L | C/L | C/L | C/L | C/L |
| 4 | wt | Col X gem3 F1 | C/L | C/L | C/L | C/L | C/L | C/L | C/L |
| 5 | wt | Col X gem3 F1 | C/L | C/L | C/L | C/L | C/L | C/L | C/L |
| 6 | Hetero | Col X gem3 F1 | C/L | C | C | C | C | C | C/L |
| 7 | Hetero | Col X gem3 F1 | C/L | C | C | C | C | C | C/L |
| 8 | Hetero | Col X gem3 F1 | C/L | C | C | C | C | C | C/L |
| 9 | Hetero | Col X gem3 F1 | C/L | C | C | C | C | C | C/L |
| 10 | Hetero | Col X gem3 F1 | C/L | C/L | C/L | C/L | C/L | C/L | C/L |
| 11 | Homo | Col X gem3 F2 | L | C | C | C | C | C | L |
| 12 | Homo | Col X gem3 F2 | L | C | C | C | C | C | L |
| 13 | Homo | Col X gem3 F2 | L | C | C | C | C | C | L |
| 14 | Homo | Col X gem3 F2 | L | C | C | C | C | C | L |
| 15 | Homo | Col X gem3 F2 | L | C | C | C | C | C | L |
| 16 | Homo | Col X gem3 F2 | L | C | C | C | C | C | L |

표 3-12. *gem3* back-cross line들을 대상으로 *gem3* 지역에서 동정된 SSLP marker로 분석한 표로서 이 지역에 Col 유래한 200Kb 이상의 DNA단편이 삽입되었음을 확인하였다.

| | Phenotype | Origin | chro. #5 SSLP/CAPS markers | | | | | | |
|------|--------------------|-----------------------|----------------------------|--------|------|--------|------|--------|-------|
| | | | MPO12a | MPO12b | B517 | M12 | H598 | M1324 | MEE6a |
| 2-1 | wt | Ler X <i>gem3</i> BC1 | | L | | L | | L | |
| 2-2 | <i>gem3</i> | Ler X <i>gem3</i> BC1 | | C/L | | No amp | C/L | C/L | |
| 2-3 | <i>gem3</i> | Ler X <i>gem3</i> BC1 | | C/L | | C/L | C/L | C/L | |
| 2-4 | wt | Ler X <i>gem3</i> BC1 | | L | | L | C/L | L | |
| 2-5 | <i>gem3</i> | Ler X <i>gem3</i> BC1 | L | C/L | | C/L | C/L | C/L | L |
| 2-6 | wt | Ler X <i>gem3</i> BC1 | L | L | | L | L | L | L |
| 2-7 | <i>gem3</i> | Ler X <i>gem3</i> BC1 | L | C/L | | C/L | C/L | C/L | L |
| 2-8 | wt | Ler X <i>gem3</i> BC1 | L | L | | L | L | L | L |
| 2-9 | Strong <i>gem3</i> | Ler X <i>gem3</i> BC1 | | C | | C | C | C | |
| 2-10 | wt | Ler X <i>gem3</i> BC1 | L | L | | L | L | L | L |
| 2-11 | <i>gem3</i> | Ler X <i>gem3</i> BC1 | L | C/L | | C/L | C/L | C/L | L |
| 2-12 | wt | Ler X <i>gem3</i> BC1 | L | L | | L | L | L | L |
| 2-13 | <i>gem3</i> | Ler X <i>gem3</i> BC1 | | C/L | | C/L | C/L | C/L | |
| 2-14 | <i>gem3</i> | Ler X <i>gem3</i> BC1 | | C/L | | C/L | C/L | C/L | |
| 2-15 | Strong <i>gem3</i> | Ler X <i>gem3</i> BC1 | | C | | C | C | C | |
| 2-16 | wt | Ler X <i>gem3</i> BC1 | L | L | | L | L | L | L |
| 2-17 | wt | Ler X <i>gem3</i> BC1 | L | L | | L | L | L | L |
| 2-18 | <i>gem3</i> | Ler X <i>gem3</i> BC2 | L | C/L | | C/L | C/L | No amp | L |
| 2-19 | <i>gem3</i> | Ler X <i>gem3</i> BC1 | | C/L | | C/L | C/L | C/L | |
| 2-20 | <i>gem3</i> | Ler X <i>gem3</i> BC1 | | C/L | | C/L | | C/L | |
| 8-1 | <i>gem3</i> | Ler X <i>gem3</i> BC1 | L | C/L | | C/L | C/L | C/L | L |
| 8-2 | <i>gem3</i> | Ler X <i>gem3</i> BC1 | L | C/L | | C/L | C/L | C/L | L |
| 8-3 | wt | Ler X <i>gem3</i> BC1 | | L | | L | L | L | |
| 8-4 | <i>gem3</i> | Ler X <i>gem3</i> BC1 | | C/L | | C/L | C/L | C/L | |
| 8-5 | wt | Ler X <i>gem3</i> BC1 | | L | | No amp | L | L | |
| 8-6 | wt | Ler X <i>gem3</i> BC1 | L | L | | L | L | L | L |
| 8-7 | <i>gem3</i> | Ler X <i>gem3</i> BC1 | L | C/L | | C/L | C/L | C/L | L |
| 8-8 | wt | Ler X <i>gem3</i> BC1 | L | L | | L | L | L | L |
| 8-9 | <i>gem3</i> | Ler X <i>gem3</i> BC1 | | C/L | | C/L | C/L | C/L | |
| 8-10 | wt | Ler X <i>gem3</i> BC1 | L | L | | L | L | L | L |
| 8-11 | <i>gem3</i> | Ler X <i>gem3</i> BC1 | L | C/L | | C/L | C/L | C/L | L |
| 8-12 | <i>gem3</i> | Ler X <i>gem3</i> BC1 | | C/L | | C/L | C/L | C/L | |
| 8-13 | wt | Ler X <i>gem3</i> BC1 | | L | | L | L | L | |
| 8-14 | <i>gem3</i> | Ler X <i>gem3</i> BC1 | | C/L | | C/L | C/L | C/L | |
| 8-15 | <i>gem3</i> | Ler X <i>gem3</i> BC1 | L | C/L | | C/L | C/L | C/L | L |
| 8-16 | <i>gem3</i> | Ler X <i>gem3</i> BC1 | L | C/L | | C/L | C/L | C/L | L |
| 8-17 | wt | Ler X <i>gem3</i> BC1 | | L | | L | L | L | |
| 8-18 | <i>gem3</i> | Ler X <i>gem3</i> BC1 | | C/L | | C/L | C/L | C/L | |
| 8-19 | <i>gem3</i> | Ler X <i>gem3</i> BC1 | L | C/L | | C/L | C/L | C/L | L |
| 8-20 | wt | Ler X <i>gem3</i> BC1 | | L | | L | L | L | |

최종적으로 애기장대 *gem3* map-based cloning을 수행함으로써 다음과 같은 결론을 얻었다. *gem3* X Col-0 교배로 유래된 F₂ mapping 기본집단 762개체들의화분 표현형을 분석한 결과, 정상화분형 308개체, 화분변이형 이형접합체 407개체, 화분변이형 동형접합체 47개체를 대상으로 5q번 염색체에 위치하는 14종의 SSLP 마커로 분석하였다. 최종으로 2개의 분자 마커 MPO12a와 MEE6a사이에 *gem3* mutation이 위치하는 것으로 밝혀졌으며, 이들 개의 마커사이의 물리적 거리는 294Kb이며 75개의 유전자가 존재하였다. Fine mapping을 계속 수행하던 중, *gem3* 변이체에서 변이유전자 존재부위에 최소한 200Kbp 이상의 Columbia DNA 단편 삽입된 매우 비정상적인 유전적 현상을 발견하였으며, 이로 인해 back-cross (*gem3* X Ler) 집단을 전개, 918 개체 DNA를 전개하여 각각 genomic DNA를 추출하여 map-based cloning 계속 수행하였다.

이 집단을 대상으로 5번 염색체 294Kbp 지역에 위치하는 8개의 분자마커로 분석하여 최종적으로 2개의 마커 M40680와 H598 사이에 *gem3* 유전자가 존재함이 밝혔다. 이들 2개의 마커사이의 물리적 거리는 83.3Kb이며, 표 3-13에 제시된 18개의 유전자들이 존재하였다.

표 3-13. M40680과 H598사이 83.3Kbp 지역에 존재하는 유전자들과 Arabidopsis seed stock center로부터 분양받은 Knock-out lines 개수.

| Locus | Gene product name | No. KO lines |
|-----------|---|--------------|
| At5g40690 | expressed protein | 1 |
| At5g40700 | expressed protein | 1 |
| At5g40710 | zinc finger (C2H2 type) family protein | 2 |
| At5g40720 | expressed protein | 2 |
| At5g40730 | arabinogalactan-protein (AGP24) | 1 |
| At5g40740 | expressed protein | 2 |
| At5g40750 | hypothetical protein | - |
| At5g40760 | glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase / G6PD (ACG12) | 3 |
| At5g40770 | prohibitin | 1 |
| At5g40780 | amino acid permease | 1 |
| At5g40790 | hypothetical protein | 1 |
| At5g40800 | hypothetical protein | 1 |
| At5g40810 | cytochrome c1, putative | 2 |
| At5g40820 | FAT domain-containing protein / phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family protein | 3 |
| At5g40830 | expressed protein | 3 |
| At5g40840 | cohesion family protein SYN2 (SYN2) | 3 |
| At5g40850 | uroporphyrin III methylase (UPM1) | 2 |
| At5g40855 | hypothetical protein | 1 |

● gem3 genomic sequence

```

GCATTGCCGG ACGATTTGCT CGTGCCGATT TTGTTATTGG TTCCAACAAA GGCTGCAGTG GCTACCATGA TTTTGTCAAA AAGATGGCAG TTTATTGGG
CGATGGTGCC STAGCTGAAG TACATAGATA TCAAGATTT TGTACCACAA AAAATAAAAT CTAGACCGTT TATTTGGAGA AAGTGAGCGA CGACAACAGT
CTATTTAGTG GTTCTTAAAC GAGTCATTGG GACTCCACAA GGCACCTATA TTAGAAAGAT TGACTATAAA ACTCGGTCCA CATTTGCTCG TTAATGCTAA
CGTGGGAATG TGGATTGGAA ATGCGGTTGA TCGCAGGTT CGTAAACTAG CGTCCAGCT CATGTGGTCC GCAGAACCTA CTAGCTTGCC CAAAAGCCTT
TATACATGTG AAACCGTTGT GTATATATCT CCATCTTTCC AACAAAGTTT TTGTAGATGT TTCTTCTCCG GTATGCTCCG CATCCCTCAA ACGTCTTCTC
ATTGCTTTG TGGTATACAA AGATGATGAT TATGTTGTTA GGCTCTTATG GAGTTGTCTT ATCTCTGAAAT ATATGTATGT GTTGTACAT GAGCAAGAGA
ATGTGACAAA GTTTAGTGTG TAAATCCAT GTTAGAGAC TTAAATATAI TTTTATTTGA AACCAAAAGT ACTTCAAGAG TAGATATTG SAGCATCTT
SGCATAGAT TCTAAGATT TAAAGAAAT TTTCATGCA GATTATTCTA CAAACTGCTG TCGATGAA AACAAAGCTA GTTTGAGAA AGCAGTTATC
TACGTTTATG GGTGTTA TACTG TACCCGTGATG ACAAATTAI GAGATCTCTT TCCTCAGTCA GATATCTCGA GATACGCTCA AGCGTTGCAA GGTACTT--
-----T TTATTATAC TGCATTATT TATTGTAATG A-TTACATT CCAACAGTTA CTTATGTGT GCTGTGTCA TTGCATATTC CGTGTGCCA
CGCCATTAAC TTCTCACAGC TTATAGAGTG TAAAATATGT CTCTTTGATG TAAATGGTT TGAGCCATTA GTGTCTTTTG CTTCAAATTT CTCTGAAAT
GAAAGTTTTT CTCATCAACC AGGTCCGTGT TTGTGCATGC ATTAATAAAA GTAAAAACTT CAAAATAGC AAACATGTTA ATTACTTTCC TTGATGTTGT
TGCTTCGCAA TTATGGTATA GGAGTGAAGC TTTTTCGCGT TCGTGAAGG AAGCGAATGA ATACTCTCGA TGCTGTCAA CCAACTCAA SRTCTTTGCA
TGGAAAGAA ATGAGCCGAG AAGCGAAGCA AACCAAGTGT TAGTTTACA TCTTCCAGC TCCAAATGTT TAAAGAGAGC TGGATCTCA TTGAATCAA
CCTGGAAATG GATATAAAGG AAGATAATGA AGGAGTTGAA ATCCATGTAI AGGATATCAA CAACCTCTCA GCTTCTCTTC TCCACTCAA TGGAGTTTAA
GCTTTGTGG ACTCCATTTA GAAACAACCT AACTAACCTC AAAATTTGAG TTTGATGCTT CCCCCTCTG ACTAGTACTA ATAAGCTATA TCAAGACTCA
TATGTATA

```

Arabidopsis seed stock center로부터 총 31개의 Knock-out 계통을 분양받아 화분표현형을 조사하였으나, *gem3* 표현형을 보이는 개체를 발견하지 못하였다. 한편 KO line이 없는 일부 유전들을 대상으로 염기서열을 분석하여 mutation 부위를 확인한 결과 At5g40750 유전자에서 매우 의미 있는 결과를 얻었다. 이 유전자는 4개의 exon으로 구성되어 있으며, exon지역에 18개의 염기치환, 결실 돌연변이가 관찰되었으며 8번째 염기치환 돌연변이에 의해 TAA stop codon이 생성됨이 밝혀졌다(그림 3-25, 위 그림). 만약 이 위치에 돌연변이에 의해 *gem3*변이가 유발되었다면 *gem3* 변이체는 1/3 크기의 비정상적인 transcript를 만들 것으로 예상된다(그림 3-25, 아래 그림). 현재 정상적 유전자를 이용하여 genetic complementation을 위한 vector를 제작하였으며, *gem3* 변이체를 대상으로 형질전환 실험이 수행중이다.

■ gem3 mRNA sequence

```

ATGCGAGTTT ATTTGGAAGG TGGTCCGTTA TCTGAAATCA TGGGATCCG AAGGACACTT ATATTAGAAA GATTTGACTAI AAAACTCGGT CCACTTTGTC
CTCTTAATCG TAAACGTGGG ATGTGGATTC AAAATGCGGT TGTATCCAGG GTTTTGTGAG ATGTTTCTTC TCCGATATG CTCCTATCCG TCAACACTCT
TCTCATTTTA TTGTDGTAI ACAAGAGTGA GAAATATGTT TTAGCCCTCA TATGAGTTTG TCCATCTC GAAATATAAI TTTTSTTACA ACATGACAAA
GACAAATGTA AAAAGTGTG TAAATGTC GTC GTC CATCTTAGAG ACTTTAATAT ATTTTTATTG GAAACCAAAA GTACTTGAGC AGGAAGATAT TGGAGGATCT
TTGCCATAG ATTCTAAGAT TATAAAGAAA TTCTTCATCG CAGATTATTC TACAACTCG TGCTCGATTG AGAACAAGCC TAGCTTTGAG AAAGCAGTTA
TCTACGTTTA GTCGTTTATA GTTACCCTGA TGACAAATTT ATGAGATCTC TTTCTCAGT CAGATATCTC GAGATACGTC TAAGCGTTTC AACGAAACCG
AATGAAATAC CTCATGCTT GTCAACCAAA CTC AAGATCTC TTGAGTGGAA AGAATATGGA GCGACAAGCG AAGAGAACA AGTGTAAAGT TACATCTTG
CCACTCCAA ATGTTTAAAG AGAGCTGGAA TCFCTTTGAA ATCAACCTGG AAATGGAAATA AAAAGAAGAT AATGAAGGAG TFGAAATCCA TGTATAGGAT
ATCAACAACA TCTCAGCTTC TCTTCTCCAC TCAACTGGAG TTTAAGCCTT TGTGGACTCC ATTTGAAAC AACGTAAC TAACCTCAAAT TGGAGTTTGA

```

그림 3-25. *gem3* 유전자로 추정되는 At5g40750의 구조 및 돌연변이 위치.

자. JA 생합성경로의 AOS유전자를 이용한 conditional GMS 배추 형질전환체의 육성
 유전공학적인 방법으로 음성불임을 유발하기 위해서는 음성기관, 특히 화분에서만 특이적으로 발현하는 promoter를 찾아야 한다. AOS유전자의 RNAi construct를 이용하여 음성기관의 불임을 유도할 경우, 외부 유전자의 발현이 다른 기관에는 피해를 주지 않도록 해야

하기 때문이다. 또한 F1종자를 만들었을 경우 F1식물체 자체가 도입한 RNAi에 대해 이형 접합체의 상태라 하더라도, 배추와 같이 있을 수확하는 경우에는 사용가능하나, 유채와 같이 종자를 이용하는 작물의 경우 F1식물이 불임이 될 가능성이 있기 때문이다.

농촌진흥청 배추게놈팀이 확보한 약 100,000여종의 배추 EST로부터 배추의 AOS유전자의 EST를 찾아내어 염기서열을 결정한 후, 적당한 primer를 제작하여 증폭한 후, gateway system을 이용하여 배추 형질전환용 RNAi vector를 제작하였다(그림 3-26). 배추의 화분 특이적 발현 promoter에 관하여 이용할 수 있는 정보가 현재까지 매우 제한적이므로, 애기장대에서 확인된 화분 특이적 발현 promoter 3종(*AtGEX2*, *msp2*, *lat52*)과 유채에서 회분 특이적으로 발현한다고 보고된 BRPG promoter를 이용하여 총 4종의 vector를 제작하였다(그림 3-26).



그림 3-26. 배추에서 임성회복 가능한 웅성불임성을 유도하기 위한 형질전환용 RNAi vectors.

제작된 4종의 vector를 이용하여 유채의 형질전환을 시도하였다. 이미 논문에 보고된 표준 형질전환 방법을 이용하여 형질전환 실험을 수행하였다. 먼저 무균으로 배양한 유채의 자엽조직을 0.5-1cm의 크기로 절단하여 callus유도배지에서 배양한 후, *Agrobacterium*을 감염시켜 kanamycin을 함유한 선발배지에서 이용하여 감염후의 푸른색의 callus 출현율은 약 78%이었으며, 이들로부터 shoot 출현율은 34%이었다(그림 3-27). 그러나 이들로부터 뿌리의 출현율은 매우 낮았다. 현재 rooting 효율을 증진시키는 여러 방법을 시도하고 있다. 향후 유채에 관한 형질전환 체계가 완전하게 확립되면, 형질전환 유채의 T1, T2세대에서의 불임유발 및 임성회복 test를 수행할 예정이며, 이를 이용하여 배추를 대상으로 형질전환 실험을 시도할 예정이다.



Table1. Frequency of callus induction and shoot regeneration

| Callus induction frequency (%) | Green callus induction frequency (%) | Shoot regeneration frequency (%) |
|--------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| 100% | 77.99% | 34.13% |

그림 3-27. 제작된 4종의 AOS RNAi vector를 이용한 유채의 형질전환 실험.

제4절 S-RNase 유전자의 RNA interference 방법에 의한 자가화합성 사과 계통 육성

자식(selfing)을 방어하기 위하여 동종의 화분으로부터 자기 개체 유래의 화분을 식별해서 수정시키지 않는 유전적 형질 중 가장 고도의 기구가 자가불화합성(self-incompatibility, SI)이다. 이는 Gametophytic과 Sporophytic SI로 구분된다(de Nettancourt, 1977). 과실류에 있어서 사과, 배, 양앵두 등은 자가불화합성(Gametophytic SI)의 대표적인 것으로 성공적인 수분, 수정과 결실을 위해서는 수분수의 혼식이 필수불가결하다. 사과와 많은 다른 종에서 작용하는 자가불화합성(GSI) 현상은 S 유전자좌에 복대립 유전자가 존재하는 것으로 알려져 있다(Frankel & Galun, 1977). 환경오염 및 기상악화 등의 요인으로 인하여 꽃가루 매개곤충의 활동 약화 등으로 수정, 착과율이 감소하며 당해연도 개화시기의 기상조건에 따라서 착과율이 달라지므로 안정적인 사과 생산에 위협적인 요소로 대두되고 있다.

근래에 분자생물학의 기술을 이용하여 자가불화합성(Gametophytic SI)의 기작이 밝혀지고 있으며, 자성측의 원인으로서는 style에서 발현하는 ribonucleases의 일종인 self-incompatibility ribonucleases (S-RNases) 임이 가지과(Anderson et al., 1986; McClure et al., 1986)와 장미과(Broothaerts et al., 1995; Janssens et al., 1995; Sassa et al., 1992; Tao et al., 1997) 밝혀졌고, 이는 자가 화분 관의 RNA를 분해함으로써 자식을 방어하는 것으로 알려졌다. 사과의 응성측 자가불화합성 유전자는 아직 자세히 밝혀지지 않은 상태이다. PCR 및 염기서열 분석을 통하여 빠른 시간 내에 정확한 자가불화합성 유전자형을 알아내는 여러 실험들이 되어왔다. 지금까지 사과에서는 여러 개의 S-RNase가 cloning 되어 염기서열이 결정되었다 (Boskovic & Tobutt, 1999; Verdoodt et al., 1998; Van Nerum et al., 2001; Sakurai et al., 1997; Matsumoto와 Kitahara, 2000).

동양배의 경우 자가화합성 품종인 오사이십세기(S4sm; 자가화합 S-allele)를 이용하여 자가결실성 품종을 육성하고 있으며, 양앵두의 경우에도 자가화합 선발계인 JI 2420 (S4'; 자가화합 S-allele; 'Emperor Francis' X 'Napoleon' pollen X-irradiation)을 이용하여 여러 자가화합성 양앵두가 개발되고 있다(Lapins, 1971). 사과품종에는 자가결실성 품종육성에 교배친으로 사용할 자가화합성 계통/품종이 절실히 요구되고 있으나 현재로는 없는 실정이다.

유전자 발현 억제의 여러 방법 중 최근에는 RNAi가 '유전자 knock out 방법'보다 더 효과적이라 알려져 있고(Holen et al., 2003), 여러 동식물에서 gene function을 밝혀내는 등 여러 목적으로 활용되고 있다. RNAi는 dsRNA를 식물체에 주입했을 때, 상보적인 세포 내부의 mRNA와 특이적으로 결합하여 유전자 발현 억제를 유도할 수 있는 방법이다. 과수류에서의 RNAi방법을 이용한 gene silencing의 기술 개발이 요구된다. 현재 우리나라 사과 생산에서는 여러 주요 품종이 있으나, 주 품종인 'Fuji' (S₁S₉)에 S-alleles의 RNAi법을 이용하여 자가결실성인 'Fuji' 사과품종이 요구된다. 사과에 있어서 자가결실성 품종의 개발은 인공수분에 따르는 노동력, 경비절감과 더불어 안정적인 생산을 가능하게 할 수 있다. 더불어 앞으로의 육종재료로써도 자가결실성 품종의 개발이 요구되고 있다.

1. 사과의 주두에서 발현하는 S₁-, S₂-, S₅-, 및 S₉-RNase 유전자 cloning 및 염기서열 결정

대부분의 사과품종은 타가수정을 하므로 착과가 정상적으로 이루어지기 위해서는 화합성이 있는 수분수품종을 일정비율 이상으로 혼식해 주어야 한다(Goldway et al, 2001; Schneider et al, 2001). 이렇듯 사과가 타가수정을 하는 이유는 사과품종이 자가수정을 하지 못하는 배우체형 자가불화합성 기구를 가지고 있기 때문이다(Alston, 1996). 자가불화합성 현상은 S 유전자좌에 복대립 유전자가 존재하는 것으로 알려져 있으며(S-gene), 이것은 주두 측에서 발현하는 ribonucleases의 일종으로 알려졌다. 자성측 자가불화합성 유전자인 S-RNase는 동일한 S 유전자좌에 존재하는 아직 밝혀지지 않은 옹성측 유전자와 상호작용하며, 자가화분관의 RNA를 분해함으로써 자식을 방어하는 것으로 알려졌다(Golz et al., 2001). S 유전자좌의 복대립 유전자 산물간의 인식은 주두측에서 화분관 신장이 계속 진행될 것인지 멈추게 될 것인지를 결정한다. 배우체형 자가불화합성 체계는 유전학적으로 품종의 S-allele 구성에 의해 타가수분 현상을 유도한다.

'Fuji'(S₁S₉)와 'Gala'(S₂S₅)의 주두에서 발현하는 S₁-, S₂-, S₅- 및 S₉-RNase를 cloning하여 염기서열을 분석하였다.

가. 재료 및 방법

공시 재료인 사과의 두 품종 'Fuji'와 'Gala'의 S-RNase를 분석하기 위하여 경북대학교 균위실습 포장에 재식되어 있는 두 품종의 풍선기 상태의 꽃을 채집한 후 기내에서 암술을 분리하여 실험에 사용하였다.

1) Total RNA 추출 및 RT-PCR

암술 100mg을 액체질소에 넣고 곱게 마쇄한 후 RNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN, Germany)를 이용하여 Total RNA를 추출하여 RT-PCR의 시료로 사용하였다. 역전사 반응에는 SuperScript™ III first strand synthesis system for RT - PCR(Invitrogen, USA)을 이용하였다. 반응용액은 21μl [RNA 1μg, Random hexamer 50ng/μl, 10 mM dNTP mix 1μl, 10X RT buffer, 25 mM MgCl₂, 0.1 M DTT, RNaseOUT (40 U/μl), SuperScript III RT (200 U/μl) Reverse Transcriptase 0.25U]를 가지고 수행하였다. PCR반응은 TP600(Takara, Japan)을 이용하였으며, 반응조건은 [denature 65°C, 5분 → anneal 4°C, 2분 → 25°C, 10분 → cDNA synthesis 50°C, 50분 → terminate reaction 85°C, 5분 → remove RNA 37°C, 20분 → 4°C, ∞]으로 실행하였다. RT-PCR 산물은 Spectrophotometer (Bio-Rad, USA)로 정량 후 냉동보관 하였다.

2) S-RNase의 PCR 분석

자가불화합성 유전자 S-RNase의 PCR분석을 위해 cDNA를 template DNA로 이용하였다. S-allele 특이적 Primer 조합은 Table 4-1과 같다. PCR 증폭은 TP600 (Takara, Japan)을 이용하였으며, PCR반응은 20μl 반응액으로 template DNA 1μl(약 100ng), 10X reaction buffer, primer 각 0.5μM, dNTP 2.5mM, Taq polymerase 1unit을 첨가하였다. 반응조건은 pre-denaturation (94°C, 5분) 1cycle, denaturation (94°C, 30초) ; annealing (56°C, 30초) ; extension (72°C, 30초) 25cycle, post extension은 (72°C, 5분) 1cycle로 실시하였다.

Table 4-1. Primers for S-RNase cloning in 'Fuji' and 'Gala'.

| Cultivar | S-genotype | Primer direction | Sequence |
|----------|----------------|------------------|----------------------------|
| Fuji | S ₁ | Forward | 5'-GCGTCTTCCCAATACAGAA-3' |
| | | Reverse | 5'-AGCCGCGCTCTTAATACTGA-3' |
| | S ₉ | Forward | 5'-CGGCTGTCTGCCACTTTAAT-3' |
| | | Reverse | 5'-CGCCTTTGAGAGGATTCAG-3' |
| Gala | S ₂ | Forward | 5'-GCTGCCTGCAACTCTAATCC-3' |
| | | Reverse | 5'-GGTTCAATCTTGGCCTTTGA-3' |
| | S ₅ | Forward | 5'-ATTTGGCCGAACGTATTCAA-3' |
| | | Reverse | 5'-CCATTCTTCGTTTGGCACTT-3' |

3) S-RNase cloning 및 sequencing

PCR 후 증폭 산물은 1.2% agarose gel에서 1X TBE로 전기영동하였으며, Ethidium Bromide로 염색하고 UV transilluminator(UVP, UK)상에서 확인하였다. 목적 밴드를 잘라 QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 정제하고 pGEM-T Easy vector(Promega, USA)를 이용하여 ligation시켰다. Ligation 산물은 E.coli(DH5- α)에 heat-shock법을 이용하여 transformation 시킨 후 IPTG/X-gal이 포함 된 LB-Amp배지에 도말하여 37°C에서 배양하였다. 형질전환 된 colony를 선발하여 Wizard[®] Plus SV Minipreps (Promega, USA)을 이용하여 plasmid DNA를 추출하였다. 추출한 plasmid DNA는 3730XL DNA analyzer(ABI, USA)로 염기서열을 분석하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 'Fuji'와 'Gala'에서 S-RNases 유전자 증폭

'Fuji'와 'Gala'의 cDNA를 주형으로 하여 S-RNase specific PCR (Fig 4.1)을 수행한 결과 343 bp의 S₁-RNase, 341 bp의 S₉-RNase, 350 bp의 S₂-RNase 및 281 bp의 S₅-RNase를 확인하였다.

Primer pairs:

| | |
|--------------------------|----------------------------|
| S ₁ : Forward | 5'-GCGTCTTCCCAATACAGAA-3' |
| Reverse | 5'-AGCCGCGCTCTTAATACTGA-3' |
| S ₉ : Forward | 5'-CGGCTGTCTGCCACTTTAAT-3' |
| Reverse | 5'-CGCCTTTGAGAGGATTCAG-3' |
| S ₂ : Forward | 5'-GCTGCCTGCAACTCTAATCC-3' |
| Reverse | 5'-GGTTCAATCTTGGCCTTTGA-3' |
| S ₅ : Forward | 5'-ATTTGGCCGAACGTATTCAA-3' |
| Reverse | 5'-CCATTCTTCGTTTGGCACTT-3' |

Fig. 4-1. S-allele specific primer combination.

2) 'Fuji'와 'Gala'에서 S-RNases 유전자 sequencing

PCR분석을 통해 확인된 'Fuji'와 'Gala'의 S-RNase 유전자를 TA cloning 후 3730XL DNA analyzer (ABI, USA)를 이용하여 sequencing한 결과는 다음과 같다 (Fig. 4-2).

-S₁_RNase
 ATACAGAACCAGAAGCATTACTTTGATACAGTAATCAAAATG
 TACACAACCCAGAAACAAAACGTCTCTGAAATCCTCTCAAAGG
 CGAATATAAAACCTGGTAGGAAAAACAGGCCACTGGTGGACAT
 TGAAAATGCCATACGCAATGTTATCAACAATATGACACCAAA
 ATTCAAGTGCCAAAAGAATACTAGGACATCATTGACTGAATT
 GGTGAGGTTGGTCTTTGCAGTGATAGCAACTTAACGCAGTTC
 ATAAATTGCCCCGCCATTTCCACAAGGATCACGGAATTTCT
 GCCCCACCAATATTCAGTATTAAGAGCGCG

-S₉_RNase
 ACTTTAATCCTACTCCTTGTAGAGATCCTCCTGACAAGTTGTT
 TACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAAACAGCTCAGGAAATGAC
 CCAATATACTGCAAGAATACAACCATGAATTCTACTAAGATA
 GCAAATCTGACAGCCCGGTTGGAAATTATTTGGCCCAACGTAC
 TCGATCGAACCGATCATATAACCTTCTGGAATAAACAGTGGA
 CAAACATGGCAGCTGTGGGCATCCCGCAATACAGAACGACATG
 CATTATTTGCAAACAGTAATCAAAATGTACATAACCCAGAAA
 CAAAACGTCTCTGAAATCCTCTCAAAGG

-S₂_RNase
 CTCTAATCCTACTCCTTGTAAAGATCCTCCTGACAAGTTGTTT
 ACGGTTACGGTTTGTGGCCTTCAAACATGAATCGAAGTGAAT
 TATTTAATTGCAGTAGTTCAAACGTGACTTATGCGAAGATAC
 AAAATATCCGAACCCAGTTGGAAATGATTTGGCCAAACGTAT
 TCAATCGAAAAAATCATTTAGGCTTCTGGAATAGAGAGTGGA
 ACAAACACGGCGCCTGTGGGTATCCCACAATACGGAACGACTT
 GCATTACTTTCAAACAGTAATCAAAATGTACATAACCCAGAA
 ACAAACGTCTCTGATATCCTCTCAAAGGCCAAGATTGAAC

-S₅_RNase
 ATTCAATCGAGCCGATCATGAAAGCTTCTGGCAAAAACAGTGG
 GACAAACATGGCACCTGTGGGTCTCCCACAATAATAGACAAGA
 ACCATTACTTTGAAACAGTAATCAGAATGTACATAACCGAGA
 AGCAAAACGTCTCTTATATCCTATCCAAAGCCAATATCAATCC
 GGATGGTAAAGGCAGGACACGGAAGGATATTCAAATTGCCAT
 ACGCAATAGTACCAACGATAAGGAACCAAACTCAAGTGCCAA
 ACGAAGAATG

Fig. 4-2. The partial sequences of S₁-RNase, S₉-RNase, S₂-RNase 및 S₅-RNase in 'Fuji' and 'Gala'apple.

2. 고효율적 gene silencing을 위한 RNAi vector 구축

RNAi의 작용 메카니즘은 dsRNA에 의해서 유도가 되며, dsRNA는 dicer라는 세포내의 단백질에 의해서 인식이 되며 21-26 bp 정도의 작은 조각으로 절단되어 진다 (Fire et al.,

1998). 이때 21-26 bp로 절단된 조각들을 small interfering RNA(siRNA)라고 부르고, 이들은 세포내의 RNA induced gene silencing complex(RISC)라는 단백질 복합체에 의해서 인식되고, 이들 단백질과 결합하여 상보적인 염기서열의 mRNA를 선택적으로 찾아내어 분해를 유도하므로 이런 target 유전자의 발현을 억제하는 것이다(Elbashir et al., 2001; Caplen et al., 2001; Schwarz et al., 2001; Martinez et al., 2001). RNAi는 선충을 포함해 곤충, 식물, 균류 등의 다양한 생물종간에 보존되어 있는 현상이 밝혀졌으며, 생물에서 공통적인 핵산 차원에서의 방어 시스템임이 밝혀졌다(Waterhouse et al., 2001). 이러한 원리를 이용하여 목적하는 유전자의 일부분을 식물체에 형질전환하면 목적유전자의 gene silencing을 할 수 있다. 유전자 발현 억제의 여러 방법 중 최근에는 RNAi가 '유전자 knock out 방법' 보다 더 효과적이라 알려져 있고(Holen et al., 2003), 여러 동식물에서 gene function을 밝혀내는 등 여러 목적으로 활용되고 있다.

최근 연구에 의하면 식물체의 RNAi에 의한 gene silencing시 dsRNA의 구조에 따라 그 효과가 달라진다고 보고되고 있다. 일반적인 dsRNA구조 보다는 hairpin RNA(hpRNA)가 gene silencing에 더욱 효과적이라고 한다(Wesley et al., 2001).

본 실험에서는 pK7GWIWg2(II) vector를 이용하여, PCR 만으로 목적 유전자를 vector에 삽입하고 intron을 이용한 intron hairpin RNA(ihRNA)를 형성하게 함으로써 효율적인 gene silencing이 일어날 수 있도록 vector를 구축하도록 한다.

가. 재료 및 방법

1) Gene silencing을 위한 pK7GWIWg2(II) vector 구축

고효율적인 gene silencing을 위한 RNAi vector를 구축하기 위하여 pK7GWIWg2(II) plasmid(Fig. 4-3)를 Gateway cloning system 방법을 이용하였다. Gateway vector system은 bacteriophage lamda의 sequence specific recombination 기작을 이용하는 방법으로 BP 및 LR recombination 반응으로 hpRNA vector를 제작하였다. 기본적인 방법은 다음 Fig 4-4 와 같다.

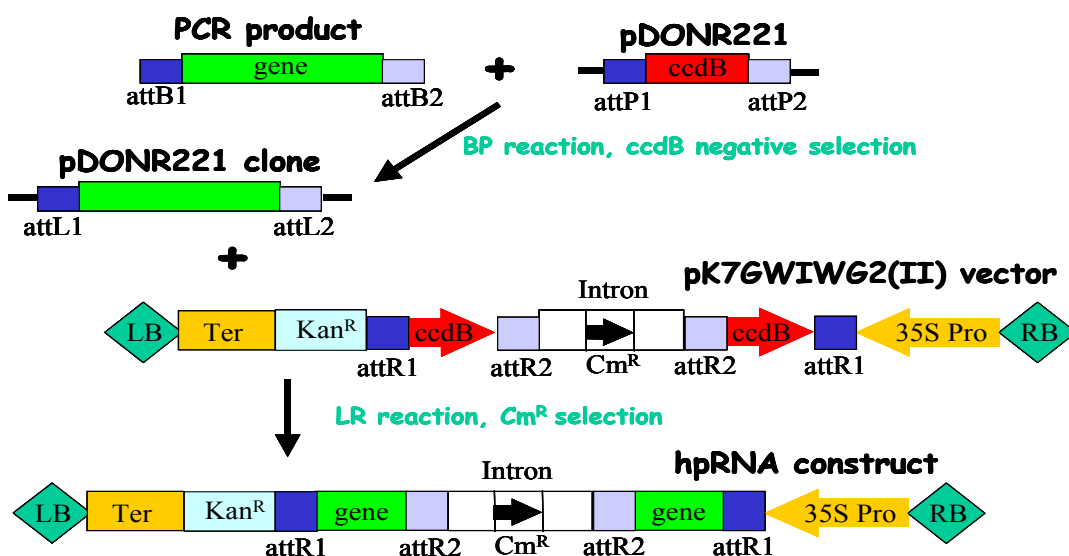


Fig. 4-4. The basic scheme of pK7GWIWg2(II) vector construction using 'Gateway cloning system'.

2) *attB*+S-allele specific primer를 이용하여 S-allele cDNA 증폭

○ *attB* adapter PCR 프로토콜은 다음과 같다.

-1st PCR

·PCR 반응용액은(total volume 20 μ l)은 cDNA 5 μ l, 10X *Pfx* amplification buffer, *attB* primer 각 0.5 μ M, 50mM MgSO₄ 0.4 μ l, 10mM dNTPs 0.75 μ l, *Pfx* DNA Polymerase 0.5unit을 첨가하였다. PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C, 3분(1cycle) \rightarrow 94 $^{\circ}$ C, 20초 ; 58 $^{\circ}$ C, 30초 ; 72 $^{\circ}$ C, 1분 (28cycle) \rightarrow 4 $^{\circ}$ C , ∞ (1cycle)로 실시하였다.

-2nd PCR

·PCR 반응용액(total volume 21 μ l)은 1st PCR 산물 1 μ l, 10X *Pfx* amplification buffer, 0.2 μ M *attB* adapt primer, 50mM MgSO₄ 0.4 μ l, 10mM dNTPs 0.5 μ l, *Pfx* DNA Polymerase 0.5unit을 첨가한 후 94 $^{\circ}$ C, 15초 ; 45 $^{\circ}$ C, 30초 ; 72 $^{\circ}$ C, 1분(5cycle) \rightarrow 94 $^{\circ}$ C, 15초 ; 55 $^{\circ}$ C, 30초 ; 72 $^{\circ}$ C, 1분(15cycle) \rightarrow 4 $^{\circ}$ C , ∞ (1cycle) 조건으로 PCR을 수행하였다.

*attB*1+S1F: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCGTCTTCCCAATACAGAA-3'

*attB*2+S1R: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGCCGCGCTCTTAATACTGA-3'

*attB*1+S9F: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGGCTGTCTGCCACTTTAAT-3'

*attB*2+S9R: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCCTTTGAGAGGATTCAG-3'

*attB*1+S2F: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCTGCCTGCAACTCTAATCC-3'

*attB*2+S2R: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGTTCAATCTTGGCCTTTGA-3'

*attB*1+S5F: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATTTGGCCGAACGTATTCAA-3'

*attB*2+S5R: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCATTCTTCGTTTGGCACTT-3'

attB primer

S-allele specific primer

Fig. 4-5. *attB*+S-allele specific primer sequence for S-allele cDNA of 'Fuji' and 'Gala'.

3) *attB* site가 연결된 PCR 산물을 pDONR221 entry vector에 재조합

Bacteriophage lamda의 *attB* site가 연결되도록 증폭시킨 PCR산물을 정제한 후 BP recombination reaction을 수행하였다.

○ *attB*-PCR 산물 정제 및 BP reaction protocol

- *attB*-PCR 산물을 정제 (30% PEG8000 + TE buffer)

- BP recombination reaction (Invitrogen) (Fig. 4-4. 참조)

· *attB* PCR 산물 + pDONR221 + 5X BP Clonase reaction buffer +TE(pH8.0)

· BP Clonase 첨가

· 배양: 25 $^{\circ}$ C/1hr

· Protease K mix 첨가 후 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 배양

반응이 완료된 용액은 *E. Coli*(DH5 α)에 형질전환 후 LB(+Kan50 μ g/ml)에서 선발하였다.

- 4) pDONR221 clone을 pK7GWIWG2(II) destination vector에 재조합
- LR recombination reaction (Invitrogen), (Fig. 4-4. 참조)
 - Plasmid DNA 정제 (QIAprep Spin Miniprep)
 - pK7GWIWG2(II) vector+pDONR221 PCR clone+5X LR reaction buffer +TE(pH8.0)
 - LR Clonase 첨가
 - 배양: 25 °C/1hr
 - Protease K mix 첨가 후 37°C에서 10분간 배양
 - LB medium 첨가 후 37°C/1 hour(200 rpm), LB(+Sp 100µg/ml)배지에 spread
 - Positive (Sp^R) and negative(ccdB) selection
 - Selection 배지: LB + spectinomycine(100ug/ml)
- 6) *A. tumefaciens*(GV3101)에 형질전환
- Plasmid DNA 정제 (QIAprep Spin Miniprep)
 - GV3101 + pK7GWIWG2(II) PCR clone ; 액체질소/2분 배양 후, 37 °C/5분 (Heat-shock)
 - 배양 : ice/30분
 - LB medium 첨가 후, 30°C/3hr(200rpm), LB(+Sp 100µg/ml)배지에 spread
 - Positive (Sp^R) and negative(ccdB) selection
 - Selection 배지: LB + spectinomycine (100 mg/L)

2) Gene silencing을 위한 pK7GWIWG2(II) vector constructs의 sequencing 및 구조 확인

4종의 vector에서 외부도입 유전자의 삽입여부를 확인하기 위하여 sense와 antisense 부분(Fig. 4-6)을 PCR 증폭을 하였다. PCR 증폭은 TP600 (Takara, Japan)을 이용하였으며, PCR반응은 20µl 반응액으로 pDNA 1µl(약 100ng), 10X reaction buffer, primer 각 0.5µM, dNTP 2.5mM, Taq polymerase 1unit을 첨가하였다. 반응조건은 pre-denaturation (94°C, 5분) 1cycle, denaturation (94°C, 30초) ; annealing (56°C, 30초) ; extension (72°C, 30초) 25cycle, post extension은 (72°C, 5분) 1cycle로 실시하였다.

PCR 후 증폭 산물은 1.2% agarose gel에서 1X TBE로 전기영동하였으며, Ethidium Bromide로 염색하고 UV transilluminator(UVP, UK)상에서 확인하였다. 목적 밴드를 잘라 QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 정제하고 pGEM-T Easy vector(Promega, USA)를 이용하여 ligation시켰다. Ligation 산물은 E.coli(DH5-α)에 heat-shock법을 이용하여 transformation 시킨 후 IPTG/X-gal이 포함된 LB-Amp배지에 도말하여 37°C에서 배양하였다. 형질전환 된 colony를 선발 후 Wizard[®] Plus SV Minipreps (Promega, USA)을 이용하여 plasmid DNA를 추출하였다. 추출한 plasmid DNA는 3730XL DNA analyzer(ABI, USA)로 염기서열을 분석하였다.

-S₁ RNase hpRNAi vector(sense 부분):
5'-TGAGGTTGGTCTTTGCAGTG-3'
5'-TTGATGGCCATAGGGGTTT-3'

-S₁ RNase hpRNAi vector(Antisense 부분):
5'-AACTCAGCACACCAGAGCAT-3'
5'-GGACATTGAAAATGCCATAC-3'

-S₉ RNase hpRNAi vector(sense 부분):
5'-ATCCCGCAATACAGAACGAC-3'
5'-TTGATGGCCATAGGGGTTT-3'

-S₉ RNase hpRNAi vector(Antisense 부분)
5'-AACTCAGCACACCAGAGCAT-3'
5'-TGGAATAAACAGTGGAAACAAAC-3'

-S₂ RNase hpRNAi vector(sense 부분):
5'-GTGGGTATCCCACAATACGG-3'
5'-TTGATGGCCATAGGGGTTT-3'

-S₂ RNase hpRNAi vector(Antisense 부분)
5'-AACTCAGCACACCAGAGCAT-3'
5'-TGGAATAGAGAGTGGAAACAAAC-3'

-S₅ RNase hpRNAi vector(sense 부분):
5'-GTAAAGGCAGGACACGGAAG-3'
5'-TTGATGGCCATAGGGGTTT-3'

-S₅ RNase hpRNAi vector(Antisense 부분)
5'-AACTCAGCACACCAGAGCAT-3'
5'-TCATGAAAGCTTCTGGCAA-3'

Fig. 4-6. The primers for confirming vector constructs.

나. 결과 및 고찰

○고효율적 gene silencing을 위한 RNAi cassette 디자인

'Fuji'와 'Gala'의 S-RNase silencing을 위한 4종 vector 구축하였다.

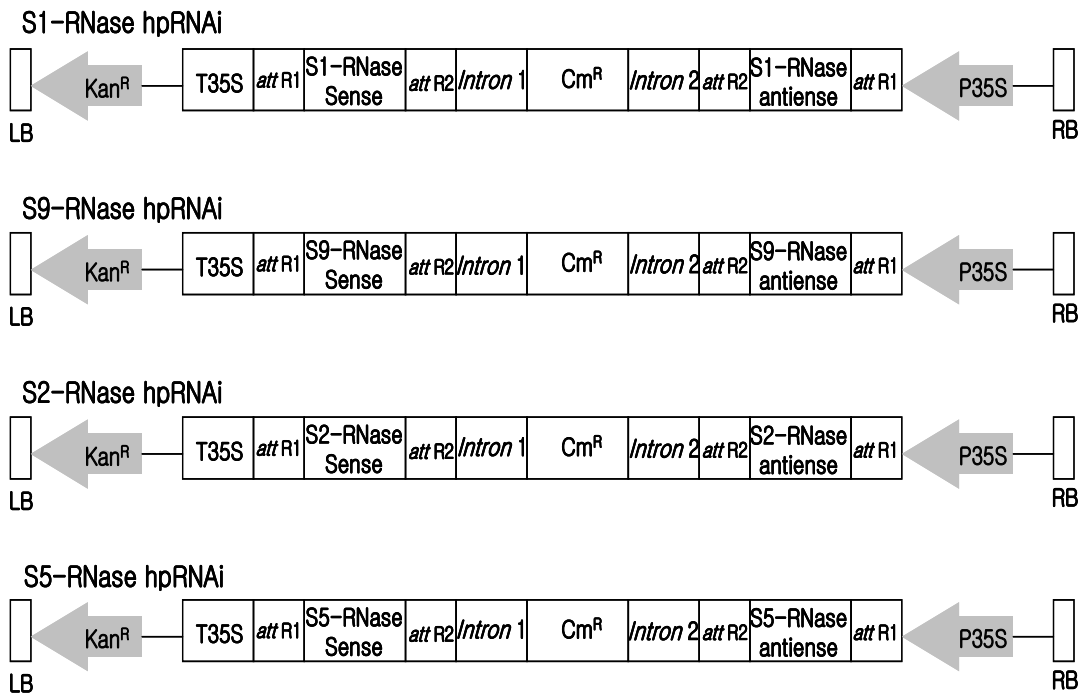


Fig. 4-7. Four vector constructs for S-RNase silencing in 'Fuji' and 'Gala' apple.

○Vector constructs의 sequencing 및 구조확인

4종 vector에서 각 2부분(sense와 antiense)을 PCR 증폭 후 염기서열을 분석하여 구조를 확인하였다.

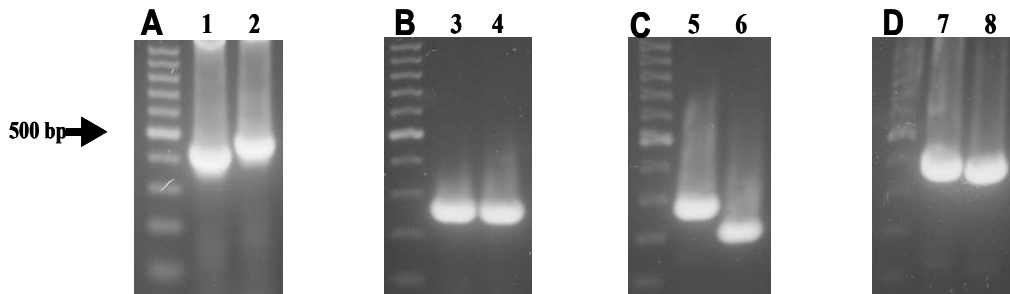
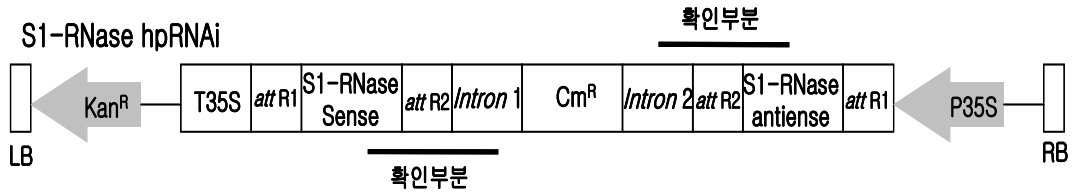


Fig. 4-8. S-RNase hpRNAi vector (A=S₁, B=S₉, C=S₂, D=S₅) 구조확인을 위한 PCR.

- Lane
1. S₁-RNase hpRNAi vector(Sense 부분)
 2. S₁-RNase hpRNAi vector(Antisense 부분)
 3. S₉-RNase hpRNAi vector(Sense 부분)
 4. S₉-RNase hpRNAi vector(Antisense 부분)
 5. S₂-RNase hpRNAi vector(Sense 부분)
 6. S₂-RNase hpRNAi vector(Antisense 부분)
 7. S₅-RNase hpRNAi vector(Sense 부분)
 8. S₅-RNase hpRNAi vector(Antisense 부분)

2) S₁-RNase hpRNAi vector의 sequence 확인



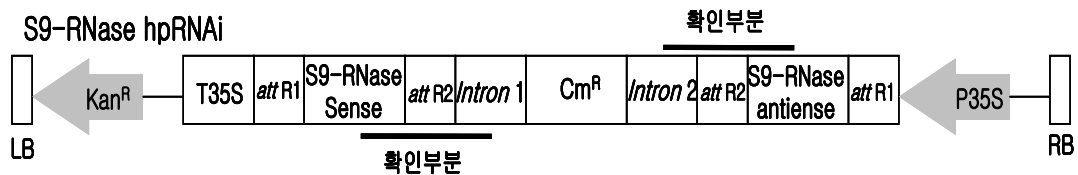
-S₁-RNase sense로부터 intron1 까지

| | | | | | |
|----------------------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|
| | 1 | TAGCAACTTA | ACGCAGTTCA | 50 | TAAATTGCC |
| S ₁ VectorSense | CCGCCCATTT | CCACAAGGAT | | | |
| intron1 | | | | | |
| S ₁ RNase | CCGCCCATTT | CCACAAGGAT | TAGCAACTTA | ACGCAGTTCA | TAAATTGCC |
| | 51 | CACGGAATTT | CTGCCCCACC | 100 | AATATTCAGT |
| S ₁ VectorSense | ATTAAGAGCG | CGCATAGTGA | | | |
| intron1 | | | | | |
| S ₁ RNase | ATTAAGAGCG | CG..... | CACGGAATTT | CTGCCCCACC | AATATTCAGT |
| | 101 | CTGGATATGT | TGTGTTTTAC | 150 | AGTATTATGT |
| S ₁ VectorSense | AGTCTGTTTT | TTATGCAAAA | | | |
| intron1 | | | | | |
| S ₁ RNase | AGTCTGTTTT | TTATGCAAAA | CTGGATATGT | TGTGTTTTAC | AGTATTATGT |
| | 151 | TCTAATTTAA | TATATTGATA | 200 | TTTATATCAT |
| S ₁ VectorSense | TTTACGTTTC | TCGTTTCAGCT | | | |
| intron1 | | | | | |
| S ₁ RNase | TTTACGTTTC | TCGTTTCAGCT | TCTAATTTAA | TATATTGATA | TTTATATCAT |
| | 201 | TTCTTG TACA | AAGTGGTTGC | 250 | TGTTATGTTC |
| S ₁ VectorSense | AGTGTCAAGC | TGACCTGCAA | | | |
| intron1 | | | | | |
| S ₁ RNase | AGTGTCAAGC | TGACCTGCAA | TTCTTG TACA | AAGTGGTTGC | TGTTATGTTC |
| | 251 | ACACGTTAAA | TGCTAAGAAG | 300 | TTAGAATATA |
| S ₁ VectorSense | TGAGACACGT | TAACTGGTAT | | | |
| intron1 | | | | | |
| S ₁ RNase | TGAGACACGT | TAACTGGTAT | ACACGTTAAA | TGCTAAGAAG | TTAGAATATA |
| | 301 | ATGAATAAGC | TGTAAATAAC | 350 | CGAGTATAAA |
| S ₁ VectorSense | CTCATTAAC | AATATCACCT | | | |
| intron1 | | | | | |
| S ₁ RNase | CTCATTAAC | AATATCACCT | ATGAATAAGC | TGTAAATAAC | CGAGTATAAA |
| | 351 | CTAGAGTATA | ATATAATCAA | 400 | ATTTCGACAAT |
| S ₁ VectorSense | TTGACTTTCA | AGAGTAGGCT | | | |
| intron1 | | | | | |
| S ₁ RNase | TTGACTTTCA | AGAGTAGGCT | CTAGAGTATA | ATATAATCAA | ATTTCGACAAT |
| | 401 | AATGTAAAAT | CTTTATATAT | 450 | TTCTACAATG |
| S ₁ VectorSense | TTCAAAGAAA | CAGTTGCATC | | | |
| intron1 | | | | | |
| S ₁ RNase | TTCAAAGAAA | CAGTTGCATC | AATGTAAAAT | CTTTATATAT | TTCTACAATG |
| | 451 | TAAACCCCTA | TGGCCATCAA | ATTCAATGAA | CGCT..... |
| S ₁ VectorSense | TAAACCCCTA | TGGCCATCAA | ATTCAATGAA | CGCT..... | ... |
| intron1 | | | | | |
| S ₁ RNase | TAAACCCCTA | TGGCCATCAA | ATTCAATGAA | CGCT..... | ... |

-intron2부터 S₁-RNase antisense

| | | | | | |
|----------------------------------|-------|---|------------|-----|------------|
| | 1 | TATATTGGTG | GCTCAAATCA | 50 | TAGAAACTTA |
| S ₁ VectorAntisense | | | | | |
| CAGTGAAGAC ACAGAAAGCC | | | | | |
| S ₁ _RNase(Antisense) | | | | | |
| Intron2 | | TATATTGGTG | GCTCAAATCA | | TAGAAACTTA |
| CAGTGAAGAC ACAGAAAGCC | | | | | |
| | 51 | GTAAGAAGAG | GCAAGAGTAT | 100 | GAAACCTTAC |
| S ₁ VectorAntisense | | | | | |
| CTCATCATTTT CCATGAGGTT | | | | | |
| S ₁ _RNase(Antisense) | | | | | |
| Intron2 | | GTAAGAAGAG | GCAAGAGTAT | | GAAACCTTAC |
| CTCATCATTTT CCATGAGGTT | | | | | |
| | 101 | GCTTCTGATC | CCGCGGGATA | 150 | TCACCACCTT |
| S ₁ VectorAntisense | | | | | |
| GTACAAGAAA GCTGAACGAG | | | | | |
| S ₁ _RNase(Antisense) | | | | | |
| Intron2 | | GCTTCTG | | | |
| | 151 | AAACGTAAAA | TGATATAAAT | 200 | ATCAATATAT |
| S ₁ VectorAntisense | | | | | |
| TAAATTAGAT TTTGCATAAA | | | | | |
| S ₁ _RNase(Antisense) | | | | | |
| Intron2 | | | | | |
| | 201 | AAACAGACTA | CATAATACTG | 250 | TAAAACACAA |
| S ₁ VectorAntisense | | | | | |
| CATATCCAGT CACTATGCGC | | | | | |
| S ₁ _RNase(Antisense) | | |CGC | | |
| Intron2 | | | | | |
| | 251 | GCTCTTAATA | CTGAATATTG | 300 | GTGGGGCAGA |
| S ₁ VectorAntisense | | | | | |
| AATTCCGTGA TCCTTGTTGA | | | | | |
| S ₁ _RNase(Antisense) | | | | | |
| Intron2 | | GCTCTTAATA | CTGAATATTG | | GTGGGGCAGA |
| AATTCCGTGA TCCTTGTTGA | | | | | |
| | 301 | AATGGGCGGG | GGCAATTTAT | 350 | GAAGTGCCTT |
| S ₁ VectorAntisense | | | | | |
| AAGTTGCTAT CACTGCAAAG | | | | | |
| S ₁ _RNase(Antisense) | | | | | |
| Intron2 | | AATGGGCGGG | GGCAATTTAT | | GAAGTGCCTT |
| AAGTTGCTAT CACTGCAAAG | | | | | |
| | 351 | ACCAACCTCA | ACCAATTCAG | 400 | TCAATGATGT |
| S ₁ VectorAntisense | | | | | |
| CCTAGTATTC TTTTGGCACT | | | | | |
| S ₁ _RNase(Antisense) | | | | | |
| Intron2 | | ACCAACCTCA | ACCAATTCAG | | TCAATGATGT |
| CCTAGTATTC TTTTGGCACT | | | | | |
| | 401 | TGAATTTTGG TGTCATATTG TTGATAACAT TG..... .. | | | |
| S ₁ VectorAntisense | | | | | |
| S ₁ _RNase(Antisense) | | | | | |
| Intron2 | | | | | |

3) S₉-RNase hpRNAi vector의 sequence 확인



-S₉-RNase sense로부터 intron1 까지

| | | | | | |
|----------------------------|---------|--------------------------------------|------------|-----|------------|
| | 1 | GCATTATTTG | CAAACAGTAA | 50 | TCAAAATGTA |
| S ₉ VectorSense | | | | | |
| CATAACCCAG AAACAAAACG | | | | | |
| | intron1 | | | | |
| S ₉ RNase | | GCATTATTTG | CAAACAGTAA | | TCAAAATGTA |
| CATAACCCAG AAACAAAACG | | | | | |
| | 51 | TCTCTGAAAT | CCTCTCAAAG | 100 | GCATAGTGAC |
| S ₉ VectorSense | | | | | |
| TGGATATGTT GTGTTTAC | | | | | |
| | intron1 | | | | |
| S ₉ RNase | | TCTCTGAAAT CCTCTCAAAG G..... | | | |
| | 101 | GTATTATGTA | GTCTGTTTTT | 150 | TATGCAAAAT |
| S ₉ VectorSense | | | | | |
| CTAATTTAAT ATATTGATAT | | | | | |
| | intron1 | | | | |
| S ₉ RNase | | | | | |
| | 151 | TTATATCATT | TTACGTTTCT | 200 | CGTTCAGCTT |
| S ₉ VectorSense | | | | | |
| TCTTGTACAA AGTGGTTGCT | | | | | |
| | intron1 | |TGCT | | |
| S ₉ RNase | | | | | |
| | 201 | GTTATGTTCA | GTGTCAAGCT | 250 | GACCTGCAAA |
| S ₉ VectorSense | | | | | |
| CACGTTAAAT GCTAAGAAGT | | | | | |
| | intron1 | | | | |
| S ₉ RNase | | GTTATGTTCA | GTGTCAAGCT | | GACCTGCAAA |
| CACGTTAAAT GCTAAGAAGT | | | | | |
| | 251 | TAGAATATAT | GAGACACGTT | 300 | AACTGGTATA |
| S ₉ VectorSense | | | | | |
| TGAATAAGCT GTAAATAACC | | | | | |
| | intron1 | | | | |
| S ₉ RNase | | TAGAATATAT | GAGACACGTT | | AACTGGTATA |
| TGAATAAGCT GTAAATAACC | | | | | |
| | 301 | GAGTATAAAC | TCATTAACTA | 350 | ATATCACCTC |
| S ₉ VectorSense | | | | | |
| TAGAGTATAA TATAATCAAA | | | | | |
| | intron1 | | | | |
| S ₉ RNase | | GAGTATAAAC | TCATTAACTA | | ATATCACCTC |
| TAGAGTATAA TATAATCAAA | | | | | |
| | 351 | TTCGACAATT | TGACTTTCAA | 400 | GAGTAGGCTA |
| S ₉ VectorSense | | | | | |
| ATGTAAAATC TTTATATATT | | | | | |
| | intron1 | | | | |
| S ₉ RNase | | TTCGACAATT | TGACTTTCAA | | GAGTAGGCTA |
| ATGTAAAATC TTTATATATT | | | | | |
| | 401 | TCTACAATGT TCAAAGAAAC AGTTGCATCT AAA | | | |
| S ₉ VectorSense | | | | | |
| intron1 | | TCTACAATGT TCAAAGAAAC AGTTGCATCT AAA | | | |
| S ₉ RNase | | | | | |

-intron2부터 S₉-RNase antisense

| | | | | | |
|----------------------------------|---------|------------|------------|-----|------------|
| | 1 | TATATTGGTG | GCTCAAATCA | 50 | TAGAAACTTA |
| S ₉ VectorAntisense | | | | | |
| CAGTGAAGAC ACAGAAAGCC | | | | | |
| | Intron2 | | | | |
| S ₉ RNase (Antisense) | | TATATTGGTG | GCTCAAATCA | | TAGAAACTTA |
| CAGTGAAGAC ACAGAAAGCC | | | | | |
| | 51 | GTAAGAAGAG | GCAAGAGTAT | 100 | GAAACCTTAC |
| S ₉ VectorAntisense | | | | | |
| CTCATCATTT CCATGAGGTT | | | | | |
| | Intron2 | | | | |
| S ₉ RNase (Antisense) | | GTAAGAAGAG | GCAAGAGTAT | | GAAACCTTAC |
| CTCATCATTT CCATGAGGTT | | | | | |

```

          101                      150
S9VectorAntisense      GCTTCTGATC      CCGCGGGATA      TCACCACTTT
GTACAAGAAA GCTGAACGAG
S9_RNase(Antisense)
Intron2      GCTTCTG.....

          151                      200
S9VectorAntisense      AAACGTAAAA      TGATATAAAT      ATCAATATAT
TAAATTAGAT TTTGCATAAA
S9_RNase(Antisense)
Intron2      .....

          201                      250
S9VectorAntisense      AAACAGACTA      CATAATACTG      TAAAACACAA
CATATCCAGT CACTATGCCT
S9_RNase(Antisense)
Intron2      .....CCT

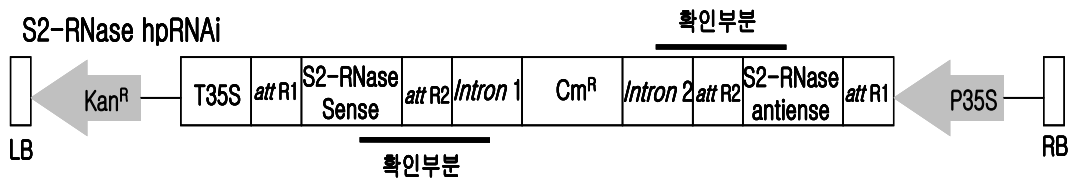
          251                      300
S9VectorAntisense      TTGAGAGGAT      TTCAGAGACG      TTTTGTTCCT
GGTTTATGTA CATTTTGATT
S9_RNase(Antisense)      TTGAGAGGAT      TTCAGAGACG      TTTTGTTCCT
GGTTTATGTA CATTTTGATT
Intron2      .....
Consensus      ttgagaggat ttcagagacg tttgtttct gggttatgta cattttgatt

          301                      350
S9VectorAntisense      ACTGTTTGCA      AATAATGCAT      GTCGTTCTGT
ATTGCGGGAT GCCCACAGCT
S9_RNase(Antisense)      ACTGTTTGCA      AATAATGCAT      GTCGTTCTGT
ATTGCGGGAT GCCCACAGCT
Intron2      .....

          351      361
S9VectorAntisense      GCCAT.....
S9_RNase(Antisense)      GCCAT.....
Intron2      .....

```

4) S₂-RNase hpRNAi vector의 sequence 확인



-S₂-RNase sense로부터 intron1 까지

```

          1                      50
S2VectorSense      CGACTTGCAT      TACTTTCAAA      CAGTAATCAA
AATGTACATA ACCCAGAAAC
intron1      .....
S2_RNase      CGACTTGCAT      TACTTTCAAA      CAGTAATCAA
AATGTACATA ACCCAGAAAC

          51                      100
S2VectorSense      AAAACGTCTC      TGATATCCTC      TCAAAGGCCA
AGATTGAACC ATAGTACTG
intron1      .....
S2_RNase      AAAACGTCTC      TGATATCCTC      TCAAAGGCCA
AGATTGAAC.....

          101                      150
S2VectorSense      GATATGTTGT      GTTTACAGT      ATTATGTAGT
CTGTTTTTTTA TGCAAAATCT
intron1      .....
S2_RNase      .....

```

| | | | | | |
|----------------------------|-----|---|------------|-----|------------|
| | 151 | AATTTAATAT | ATTGATATTT | 200 | ATATCATTTT |
| S ₂ VectorSense | | | | | |
| ACGTTTCTCG TTCAGCTTTC | | | | | |
| intron1 | | | | | |
| S ₂ RNase | | | | | |
| | 201 | TTGTACAAAG | TGGTGATATC | 250 | ACTAGTGCGG |
| S ₂ VectorSense | | | | | |
| CCGCCTGCAG GTCGACCATA | | | | | |
| intron1 | | | | | |
| S ₂ RNase | | | | | |
| | 251 | TGGTCGACCT | GCAGGCGGCC | 300 | GCACTAGTGA |
| S ₂ VectorSense | | | | | |
| TGCTGTTATG TTCAGTGTCA | | | | | |
| intron1 | | | | | |
| S ₂ RNase | | | | | |
| | 301 | AGCTGACCTG | CAAACACGTT | 350 | AAATGCTAAG |
| S ₂ VectorSense | | | | | |
| AAGTTAGAAAT ATATGAGACA | | | | | |
| intron1 | | | | | |
| S ₂ RNase | | | | | |
| Consensus | | agctgacctg caaacacggtt aaatgctaag aagttagaat atatgagaca | | | |
| | 351 | CGTTAACTGG | TATATGAATA | 400 | AGCTGTAAAT |
| S ₂ VectorSense | | | | | |
| AACCGAGTAT AAACTCATTA | | | | | |
| intron1 | | | | | |
| S ₂ RNase | | | | | |
| | 401 | ACTAATATCA | CCTCTAGAGT | 450 | ATAATATAAT |
| S ₂ VectorSense | | | | | |
| CAAATTCGAC AATTTGACTT | | | | | |
| intron1 | | | | | |
| S ₂ RNase | | | | | |
| | 451 | TCAAGAGTAG | GCTAATGTAA | 500 | AATCTTTATA |
| S ₂ VectorSense | | | | | |
| TATTTCTACA ATGTTCAAAG | | | | | |
| intron1 | | | | | |
| S ₂ RNase | | | | | |
| | 501 | AAACAGTT | | | |
| S ₂ VectorSense | | | | | |
| intron1 | | | | | |
| S ₂ RNase | | | | | |

-intron2부터 S₉-RNase antisense

| | | | | | |
|---------------------------------|-----|------------|------------|-----|------------|
| | 1 | TATATTGGTG | GCTCAAATCA | 50 | TAGAAACTTA |
| S ₂ VectorAntisense | | | | | |
| CAGTGAAGAC ACAGAAAGCC | | | | | |
| S ₂ RNase(Antisense) | | | | | |
| Intron2 | | | | | |
| CAGTGAAGAC ACAGAAAGCC | | | | | |
| | 51 | GTAAGAAGAG | GCAAGAGTAT | 100 | GAAACCTTAC |
| S ₂ VectorAntisense | | | | | |
| CTCATCATTT CCATGAGGTT | | | | | |
| S ₂ RNase(Antisense) | | | | | |
| Intron2 | | | | | |
| CTCATCATTT CCATGAGGTT | | | | | |
| | 101 | GCTTCTGATC | CCGCGGGATA | 150 | TCACCACTTT |
| S ₂ VectorAntisense | | | | | |
| GTACAAGAAA GCTGAACGAG | | | | | |
| S ₂ RNase(Antisense) | | | | | |
| Intron2 | | | | | |
| GCTTCTG... | | | | | |

```

S2VectorAntisense      151      AAACGTAAAA      TGATATAAAT      200      ATCAATATAT
TAAATTAGAT TTTGCATAAA
S2_RNase(Antisense) .....
Intron2 .....

S2VectorAntisense      201      AACAGACTA      CATAATACTG      250      TAAAACACAA
CATATCCAGT CACTATGGTT
S2_RNase(Antisense) .....GTT
Intron2 .....

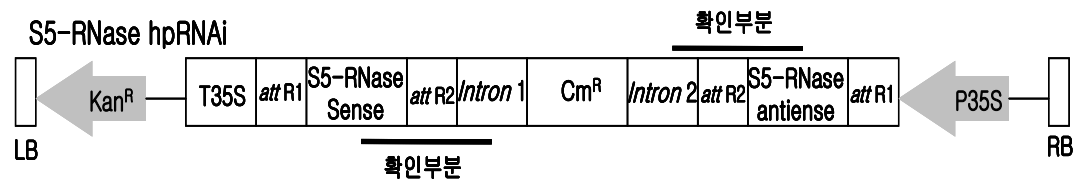
S2VectorAntisense      251      CAATCTTGGC      CTTTGAGAGG      300      ATATCAGAGA
CGTTTTGTTT CTGGGTTATG
S2_RNase(Antisense) CAATCTTGGC      CTTTGAGAGG      ATATCAGAGA
CGTTTTGTTT CTGGGTTATG
Intron2 .....

S2VectorAntisense      301      TACATTTTGA      TTACTGTTTG      350      AAAGTAATGC
AAGTCGTTCC GTATTGTGGG
S2_RNase(Antisense) TACATTTTGA      TTACTGTTTG      AAAGTAATGC
AAGTCGTTCC GTATTGTGGG
Intron2 .....

S2VectorAntisense      351      ATACCCACAG GCGCCGTGTT TGTTCCACTC TCTATTCCAG
S2_RNase(Antisense) ATACCCACAG GCGCCGTGTT TGTTCCACTC TCTATTCCAG
Intron2 .....

```

5) S₅-RNase hpRNAi vector의 sequence 확인



-S₅-RNase sense로부터 intron1 까지

```

S5VectorSense      1      ATATTCAAAT      TGCCATACGC      50      AATAGTACCA
ACGATAAAGGA ACCAAAACCTC
intron1 .....
S5_RNase      ATATTCAAAT      TGCCATACGC      AATAGTACCA
ACGATAAAGGA ACCAAAACCTC

S5VectorSense      51      AAGTGCCAAA      CGAAGAATGC      100      ATAGTGACTG
GATATGTTGT GTTTTACAGT
intron1 .....
S5_RNase      AAGTGCCAAA CGAAGAATGC .....

S5VectorSense      101      ATTATGTAGT      CTGTTTTTTA      150      TGCAAAATCT
AATTTAATAT ATTGATATTT
intron1 .....
S5_RNase .....

S5VectorSense      151      ATATCATTTT      ACGTTTCTCG      200      TTCAGCTTTC
TTGTACAAAG TGGTGATATC
intron1 .....
S5_RNase .....

```

| | | | | |
|----------------------------|-------------|------------|------------|------------|
| | 201 | | | 250 |
| S ₅ VectorSense | ACTAGTGC | CGCCTGCAG | GTCGACCATA | TGGTCGACCT |
| GCAGGCGGCC | | | | |
| intron1 | | | | |
| S ₅ RNase | | | | |
| | 251 | | | 300 |
| S ₅ VectorSense | GCACTAGTGA | TGCTGTTATG | TTCAGTGTCA | |
| AGCTGACCTG | CAAAACACGTT | | | |
| CAAACACGTT | | TGCTGTTATG | TTCAGTGTCA | AGCTGACCTG |
| intron1 | | | | |
| S ₅ RNase | | | | |
| | 301 | | | 350 |
| S ₅ VectorSense | AAATGCTAAG | AAGTTAGAAT | ATATGAGACA | |
| CGTTAACTGG | TATATGAATA | | | |
| CGTTAACTGG | AAATGCTAAG | AAGTTAGAAT | ATATGAGACA | |
| intron1 | | | | |
| S ₅ RNase | | | | |
| | 351 | | | 400 |
| S ₅ VectorSense | AGCTGTAAAT | AACCGAGTAT | AAACTCATTA | |
| ACTAATATCA | CCTCTAGAGT | | | |
| ACTAATATCA | AGCTGTAAAT | AACCGAGTAT | AAACTCATTA | |
| intron1 | | | | |
| S ₅ RNase | | | | |
| | 401 | | | 450 |
| S ₅ VectorSense | ATAATATAAT | CAAATTCGAC | AATTTGACTT | |
| TCAAGAGTAG | GCTAATGTAA | | | |
| TCAAGAGTAG | ATAATATAAT | CAAATTCGAC | AATTTGACTT | |
| intron1 | | | | |
| S ₅ RNase | | | | |
| | 451 | | | |
| S ₅ VectorSense | AATCTTTATA | TATTTCTACA | ATGTTCAAAG | AAAC |
| intron1 | AATCTTTATA | TATTTCTACA | ATGTTCAAAG | AAAC |
| S ₅ RNase | | | | |

-intron5부터 S₉-RNase antisense

| | | | |
|----------------------------------|------------|------------|------------|
| S ₅ VectorAntisense | TATTGGTGGC | TCAAATCATA | GAAACTTACA |
| GTGAAGACAC | AGAAAGCCGT | | |
| S ₅ RNase (Antisense) | | | |
| Intron2 | TATTGGTGGC | TCAAATCATA | GAAACTTACA |
| GTGAAGACAC | AGAAAGCCGT | | |
| | 51 | | 100 |
| S ₅ VectorAntisense | AAGAAGAGGC | AAGAGTATGA | AACCTTACCT |
| CATCATTTCC | ATGAGGTTGC | | |
| CATCATTTCC | AAGAAGAGGC | AAGAGTATGA | AACCTTACCT |
| intron2 | | | |
| S ₅ RNase (Antisense) | | | |
| | 101 | | 150 |
| S ₅ VectorAntisense | TTCTGATCCC | GCGGGATATC | ACCACTTTGT |
| ACAAGAAAGC | TGAACGAGAA | | |
| S ₅ RNase (Antisense) | | | |
| Intron2 | TTCTG..... | | |
| | 151 | | 200 |
| S ₅ VectorAntisense | ACGTAAAATG | ATATAAATAT | CAATATATTA |
| AATTAGATTT | TGCATAAAAA | | |
| S ₅ RNase (Antisense) | | | |
| Intron2 | | | |
| | 201 | | 250 |
| S ₅ VectorAntisense | ACAGACTACA | TAATACTGTA | AAACACAACA |
| TATCCAGTCA | CTATGCATTC | | |
| S ₅ RNase (Antisense) | | | |
| Intron2 | | | |

| | | | | | |
|---------------------------------|-------|------------|------------|-------|------------|
| | 251 | TTCGTTTGGC | ACTTGAGTTT | 300 | TGGTTCCTTA |
| S ₅ VectorAntisense | | | | | |
| TCGTTGGTAC TATTGCGTAT | | | | | |
| S ₅ RNase(Antisense) | | TTCGTTTGGC | ACTTGAGTTT | | TGGTTCCTTA |
| TCGTTGGTAC TATTGCGTAT | | | | | |
| Intron2 | | | | | |
| | 301 | GGCAATTTGA | ATATCCTTCC | 350 | TTTACCATCC |
| S ₅ VectorAntisense | | | | | |
| GGATTGATAT | | | | | |
| S ₅ RNase(Antisense) | | GGCAATTTGA | ATATCCTTCC | | GTGTCCTGCC |
| TTTACCATCC GGATTGATAT | | | | | |
| Intron2 | | | | | |
| | 351 | TGGCTTTGGA | TAGGATATAA | 400 | GAGACGTTTT |
| S ₅ VectorAntisense | | | | | |
| GCTTCTCGGT TATGTACATT | | | | | |
| S ₅ RNase(Antisense) | | TGGCTTTGGA | TAGGATATAA | | GAGACGTTTT |
| GCTTCTCGGT TATGTACATT | | | | | |
| Intron2 | | | | | |
| | 401 | CTGATTACTG | TTTCAAAGTA | 450 | ATGGTTCTTG |
| S ₅ VectorAntisense | | | | | |
| TCTATTATTG TGGGAGACCC | | | | | |
| S ₅ RNase(Antisense) | | CTGATTACTG | TTTCAAAGTA | | ATGGTTCTTG |
| TCTATTATTG TGGGAGACCC | | | | | |
| Intron2 | | | | | |
| | 451 | ACAGG | | | |
| S ₅ VectorAntisense | | | | | |
| ACAGG | | | | | |
| S ₅ RNase(Antisense) | | ACAGG..... | | | |
| Intron2 | | | | | |

3. Ethylene 억제제(AVG, AgNO₃)가 *Agrobacterium*접종 효율 및 사과잎 절편으로 더 신초 재분화에 미치는 영향

식물체의 형질전환에서 형질전환율은 다음 3단계들에서 결정되어진다. 형질전환율에 미치는 주요 단계; I. gene transfer to expanct cells, II. selection of transformed cells, III. plant regeneration from transformed cells(Bolar et al., 1998). 이들 중에서 ethylene에 관련된 단계로는 step I, 과 III 로써 식물체에 따라 혹은 식물체의 품종에 따라 달라 질수 있다고 알려져 있다(Kung & Wu, 1993). Step I 시기의 ethylene은 식물체의 상처로부터 발생하는 것으로 알려져 있으며, ethylene은 plant-microbe interaction에 영향을 미치므로 접종효율에 영향을 미칠 것으로 고려된다. 그리고 step 3에서의 ethylene의 영향은 아마 shoot와 tumour의 발생에 연관이 있을 것으로 추정되고 있다(Goh et al., 1997). AVG는 ethylene 생화학 경로에서 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다(Kumar et al., 1996). AgNO₃는 Ag²⁺ 이온이 에틸렌의 수용능력을 감소시키기 때문에 ethylene의 활성을 억제하며 에틸렌 생산에 관여하는 SAM (S-adenosylmethionine)의 유용성을 감소시킨다고 알려져 있다(Ma et al., 1998). 따라서 본 실험에서는 공동 배양기간 중 ethylene억제제의 처리가 *Agrobacterium* 접종효율과 신초 재분화율 에 미치는 영향과 ethylene의 발생량을 조사하여 형질전환효율의 향상에 기여함이 그 목적이다.

가. 재료 및 방법

사과에서의 형질전환 실험 중 transformation efficiency를 높이기 위해 ethylene 억제제를 이용한 실험을 수행하였다. 공동 배양기간(Fig. 4-9.)중 Ethylene 억제제인 Aminoethoxyvinylglycin (AVG) 과 silver nitrate (AgNO₃)의 처리가 *Agrobacterium* 접종 효율과 신초 재분화율 에 미치는 영향을 조사하였다.

Ethylene 억제제인 AVG (0.001, 0.01, 0.1, 0.5 mg/L) 와 AgNO₃ (0.1, 0.5, 1.0, 3.0 mg/L) 를 공동배지에 첨가 3일 후 *Agrobacterium* 접종효율을 측정하였다. *Agrobacterium* 접종효율은 GUS transient expression 통하여 실행하였다. 이를 위하여 pCAMBIA3301 (Fig. 4-10) vector를 *Agrobacterium* AGL 1 strain에 freeze-thaw에 방법에 의해 형질전환 하여 식물체에 형질전환용으로 사용 하였다. 공동배양3일후 GUS activity는 histological assay의

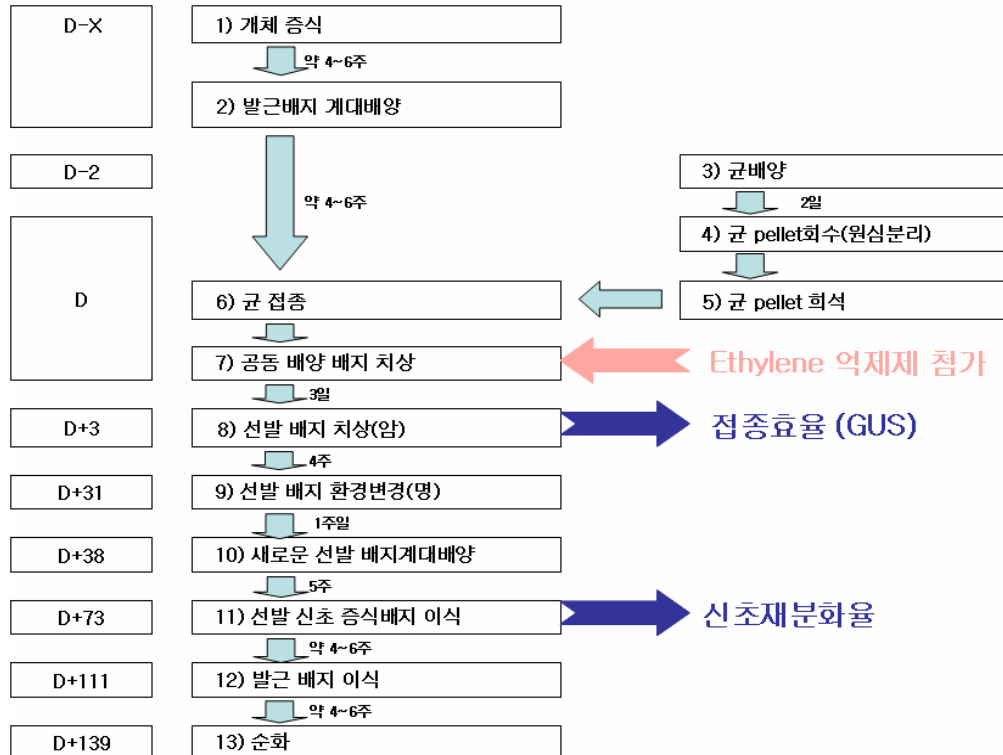


Fig. 4-9. General procedure for apple gene transformation and transformation efficiency through the control of ethylene on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer

하여 *uidA* gene의 발현을 분석하였다. 신초 재분화는 공동배양 3일후, 암배양 4주, 명배양 1주간을 실시한후, 약 5 주간의 새로운 선발배지에서 계대 배양되었다. 신초 재분화율은 선발 신초 증식배지에 이식, 4-6주후 건강한 meristem의 발생정도를 분석하였다.

Ethylene억제제가 *Agrobacterium* 접종효율과 신초재분화율에 미치는 영향을 규명하기 위하여 공동 배양시 억제제첨가 후 ethylene발생량을 측정하였다. *Agrobacterium* 접종효율에 미치는 영향을 고찰하기 위하여 억제제 첨가 후 24h 의 간격으로 3일 동안, 그리고 신초 재분화율을 위해서는 재분화유도 배양시작부터 1주일간격으로 4주일동안 ethylene 발생량을 측정하였다. 발생량측정은 각 explants의 배양용기로부터 2ml의 공기를 주사기로 채취하여 GC-14B gas chromatography에 주입 후 ethylene standard와 비교 분석하였다.

나. 결과 및 고찰

Ethylene억제제가 *Agrobacterium* 접종효율에 미치는 영향을 고찰하기위하여 억제제 첨가 후 24h 의 간격으로 3일 동안 ethylene 발생량을 측정하였다(Fig. 4-11). 3일동안의 공동배

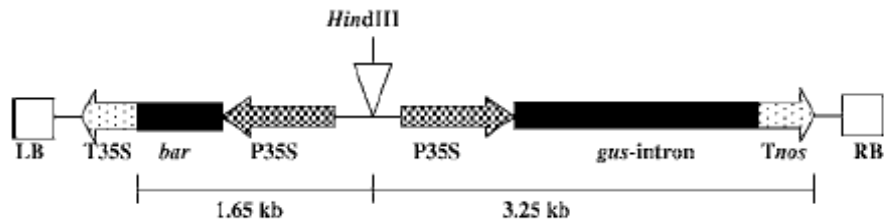


Fig. 4-10. Linear map of pCambia3301

(LB/RB-left/right T-DNA board sequences; P35S/T35S-CaMV 35S promoter/terminator; *bar*-coding region of the phosphinothricin resistance gene; *Tnos*-nopaline synthase terminator; *gus*-intron-*gusA* gene coding region with intron sequence)

양시 ethylene의 발생은 점차 증가 하는 형태로 나타났다. Ethylene 생화학 경로에서 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) 생성을 억제하는 것으로 알려진 AVG 를 0.001, 0.01, 0.1, 0.5 mg/L를 처리 하였을때는 ethylene의 발생은 거의 줄어든 것으로 나타났다. AgNO₃는 Ag²⁺ 이온이 에틸렌의 수용능력을 감소시키기 때문에 ethylene의 활성을 억제하며 에틸렌 생산에 관여하는 SAM (S-adenosylmethionine)의 유용성을 감소시킨다고 알려져 있다. AgNO₃를 0.1, 0.5, 1.0, 3.0 mg/L 처리 하였을 때는 오히려 대조구 보다 ethylene의 발생은 높게 나타났다. 이는 이미 알려진 바와 같이 AgNO₃ 가 ethylene생성을 억제하는 것이 아니라 ethylene의 생리활성을 억제하는 것이기 때문으로 고려된다.

Ethylene억제제가 신초 재분화에 미치는 영향을 조사 하기위하여 재분화유도 배양시작부터 1주일간격으로 4주일동안 ethylene 발생량을 측정하였다(Fig. 4-12). 재분화유도 배양시 ethylene의 발생은 2주째가 가장 높았으며 그다음 점차감소의 형태를 보였다. AgNO₃의 처리는 대조구보다 약 10이상의 ethylene을 발생하였다. 그러나 AVG 처리는 ethylene의 발생을 억제하는 것으로 나타났다.

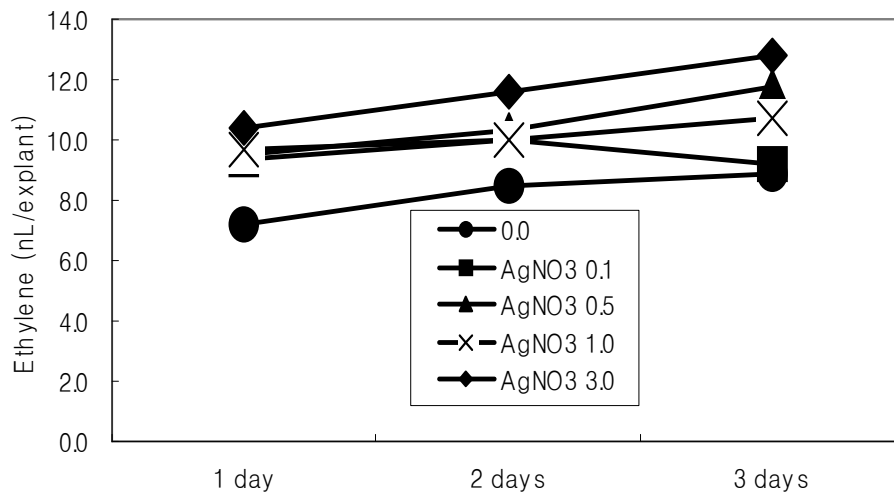
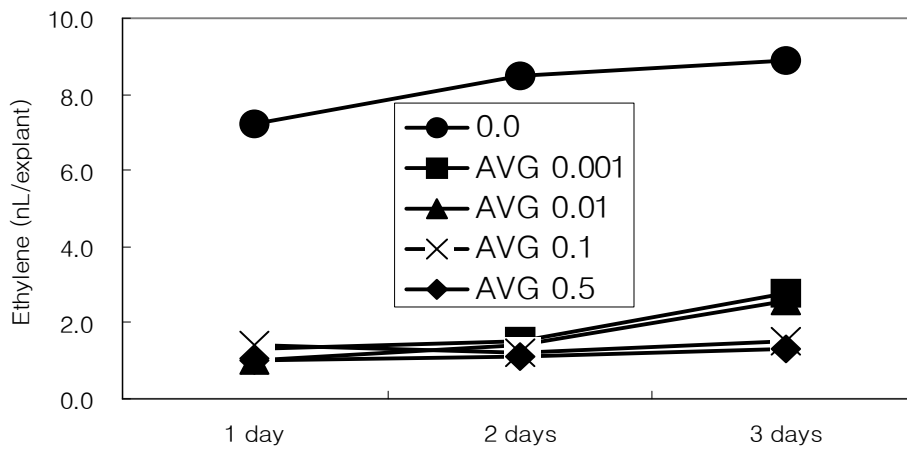


Fig. 4-11. Effects of AVG and AgNO₃ on the ethylene production during *A. tumefaciens* co-cultivation from leaf discs of 'Fuji'.

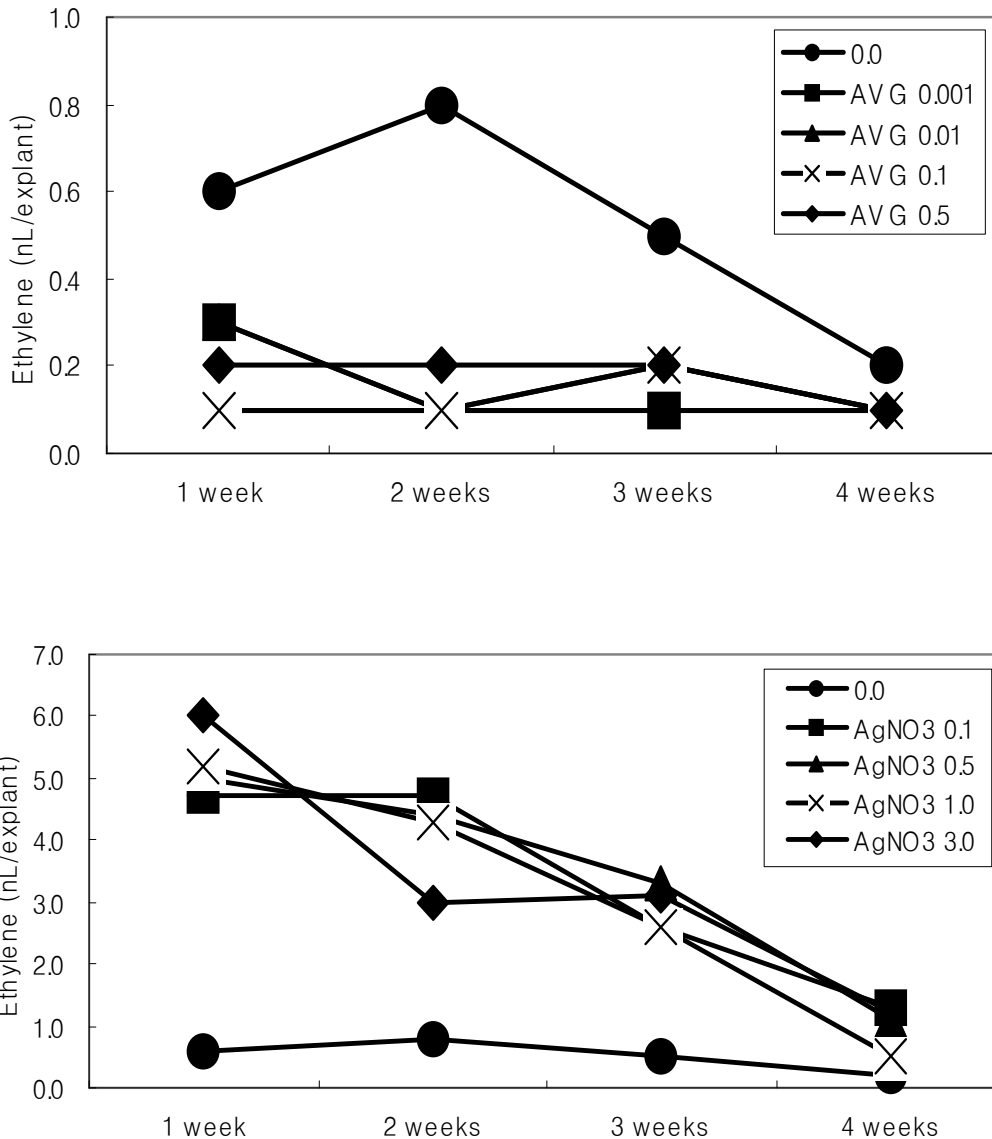


Fig 4-12. Effects of AVG and AgNO₃ on the ethylene production during regeneration from leaf discs of 'Fuji' inoculated with *A. tumerfaciens*.

3일간의 공동배양에 있어 공동배양배지에 에틸렌억제제를 첨가한후 uidA gene의 transient expression을 참조하여 Agrobacterium 접종효율을 조사 하였다 (Fig. 4-13). 청색의 Agrobacterium 접종효율은 접종 2일부터 나타났다. 각개체당 발현의 크기정도는 대조구 보다는 ethylene억제제의 처리구가 대부분 크게 나타났다. Agrobacterium 접종효율은 전체 조사한 explant 중에서 uidA gene을 발현한 explant의 비율로 나타내었다. Agrobacterium 접종효율은 AVG 0.1 mg/L의 처리시 가장 높은 73.6%, 다음 AgNO₃ 0.1 mg/L 처리시 71.8%의 효율을 나타내었다. 대조구의 경우에는 3.6%로 낮은 수준을 나타내었고, Duncan test의 결과 고도로 유의하게 차이를 보였다. AVG 처리 시는 평균 64.2%,

AgNO₃ 처리 시는 평균 56.7%의 접종효율을 나타내었고, 처리구간의 유효성은 나타나지 않았다. Agrobacterium 접종효율에 있어서 ethylene 억제제의 처리는 매우효과적인 것으로 나타났다.

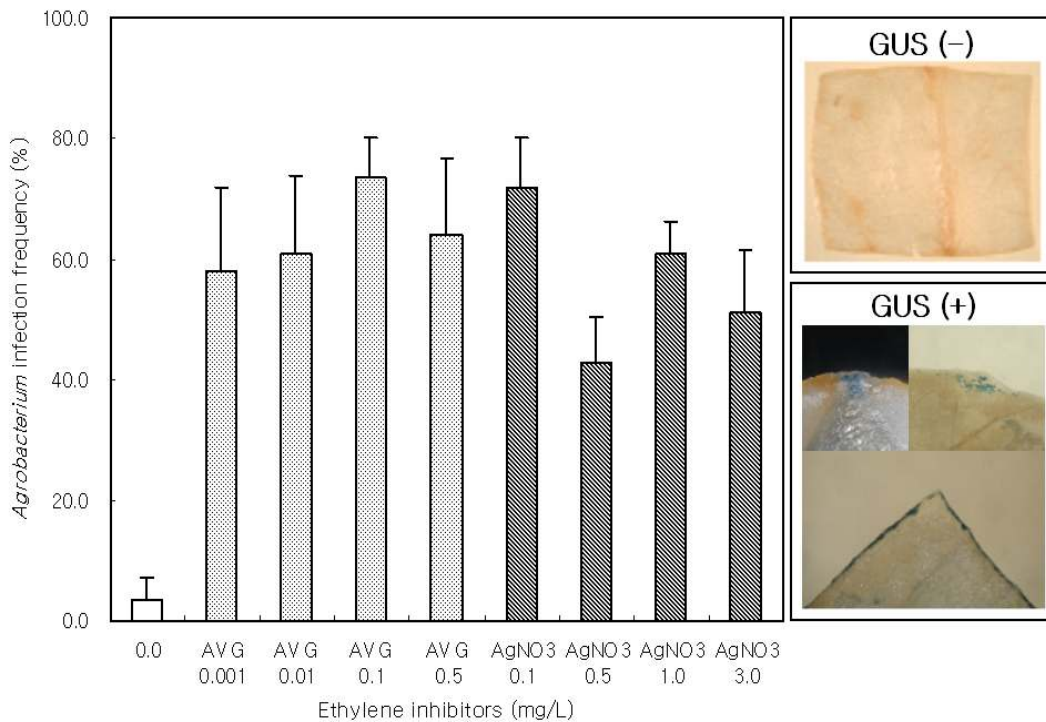


Fig. 4-13. Effects of AVG and AgNO₃ on transgene expression mediated by *Agrobacterium* in cotyledonary explants of 'Fuji' apple. (^aInfection frequency (%) = no. of GUS positive explants/no. of explants examined.)

신초 재분화는 공동배양 3일후, 암배양 4주, 명배양 1주간을 실시 한후, 약 5 주간의 새로운 선발배지에서 계대 배양되었다. 신초 재분화율은 선발 신초 증식배지에 이식, 4-6주후 건강한 meristem의 발생정도를 'Fuji' 'Gala' 와 '감홍'등 3개의 사과 품종별로 분석하였다 (Fig. 4-14). 'Fuji'의 경우 AVG 0.001mg/L 처리시 76.2%로 가장 높은 신초 재분화율을 보였다. 무처리의 경우에는 약 70.1%의 신초재분화율을 나타내었다. AVG처리시 전체평균은 69.7%로 대조구와 비슷한 재분화율을 보였고, AgNO₃의 처리 시에는 26.4%로 대조구보다 낮은 재분화율을 보였다. 'Gala'와 '감홍'의 경우도 AVG 처리보다 AgNO₃의 처리는 낮은 재분화율을 보였다. 공통적으로 AgNO₃의 경우에는 재분화를 억제하고, 즉 재분화가 아닌 callus화나 nodulation의 경향을 보였다. 그래서 공동배양 기간 중의 ethylene 억제제인 AgNO₃의 첨가가 다음 단계인 선발배지의 형질전환 신초의 분화를 억제한다면, 공동배양 기간 중에 AVG 0.001 - 0.1mg/L를 첨가하는 것이 재분화에 영향을 주지 않으면서 접종효율을 향상 시키므로 전체 형질전환효율을 향상 시킬수 있다고 고려된다.

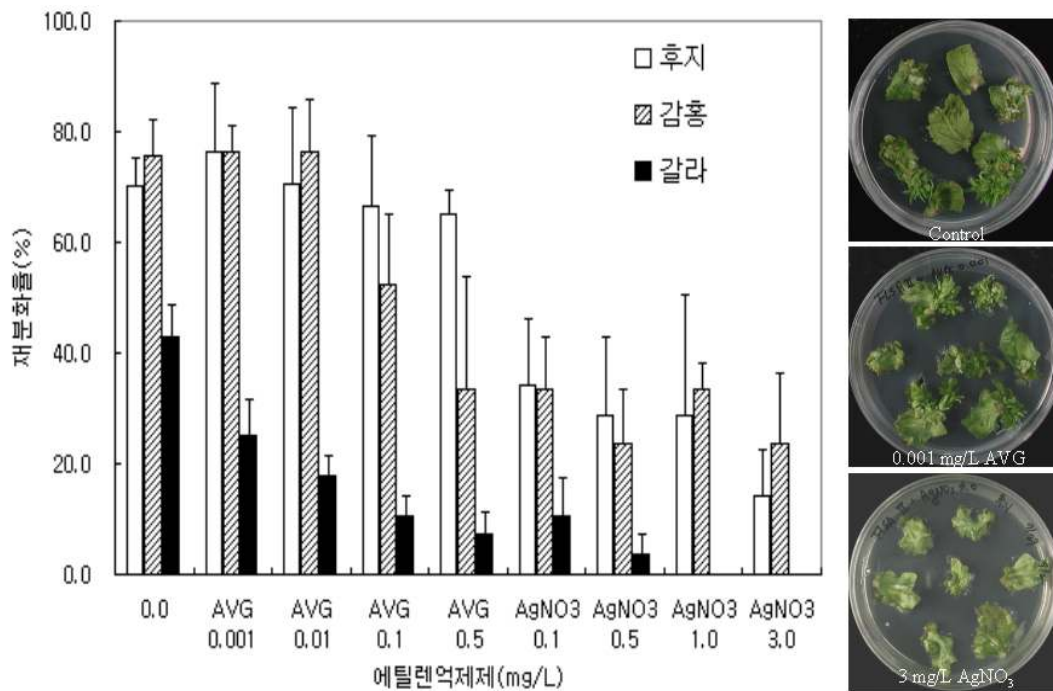


Fig. 4-14. Effects of AVG and AgNO₃ on shoot regeneration of 'Fuji', 'Gala' and 'Gamhong' apple.

4. 사과에서의 형질전환효율성 향상을 위한 요인 분석

사과 및 많은 과수류에서는 *Agrobacterium tumerfaciens*나 *A. rhizogenes* 등이 형질전환용으로 이용되어왔다. *A. tumerfaciens*의 strain 중에서 EHA105, GV3301, LBA4404등이 과수류의 형질전환에 널리 이용되고 그 효율은 과종 및 genotype에 다르다고 알려져 있다 (Hellens et al., 2000; Song & Sink, 2004). 또한 높은 재분화의 효율성을 위하여 딸기류에서는 공동배양 후 10일 동안은 kanamycin을 첨가 하지 않은 배지에서 배양 후 선발을 하는 post selection (or delayed selection) 방법을 이용하는 것이 매우 중요하다고 보고되었다. 이는 형질전환된 single cell의 경우 selection pressure 를 견디기 어렵다고 고려된다 (Alsheikh et al., 2002). 하지만 몇 일 동안의 세포분열을 통하여 형성된 다세포 cluster는 single cell 보다 selection pressure에 견디는 것이 훨씬 나아진다고 판단되기 때문이다. 공동배양 후 선발배지에서의 다양한 종류의 항생제들은 남아있는 *Agrobacterium*을 제거하기 위해 사용되어져 왔다. 하지만 이들의 종류와 농도에 따라서 재분화 효율이 달라진다고 알려져 있다(Alsheikh et al., 2001; Horsch et al., 1985; Cevera et al., 1998).

가. 재료 및 방법

식물체의 형질전환에서 형질전환율은 다음 3단계들에서 결정되어진다. 형질전환율에 미치는 주요 단계; I. gene transfer to explant cells, II. selection of transformed cells, III. plant regeneration from transformed cells(Bolar et al., 1998). 이들 중에서 ethylene에 관련된 단계로는 step I, 과 III 로써 식물체에 따라 혹은 식물체의 품종에 따라 달라 질수 있다고 알려져 있다(Kung & Wu, 1993). Step I 시기의 ethylene은 식물체의 상처로부터 발생하는

것으로 알려져 있으며, ethylene은 plant-microbe interaction에 영향을 미치므로 접종효율에 영향을 미칠 것으로 고려된다. 그리고 step 3에서의 ethylene의 영향은 아마 shoot와 tumour의 발생에 연관이 있을 것으로 추정되고 있다(Goh et al., 1997).

나. 결과 및 고찰

'Fuji'와 'Gala'품종을 두 종류의 *Agrobacterium* strain에 따라서 GUS transient expression은 다르게 나타났다 (Fig. 4-16). 3일간의 공동배양이후 두 개의 strain에서 모두에서 'Fuji'에서의 *agrobacterium*의 infection은 훨씬 높았다. 두 사과 품종에서는 LBA4404가 GV3101보다 훨씬 높게 나타났다. 따라서 본시험에서는 LBA4404를 이용하여 형질 전환 하도록 한다.

'Gala'에서의 공동배양기간을 48hr 과 72hr을 처리했을때 GUS transient expression은 차이가 없었고, 신초의 재분화율은 높은 것으로 파악되었다. 하지만 'Gala'에서의 공동배양 기간에 따른 초기실험에 사용된 엽절편체의 숫자가 너무 적은수이기 (각각 약 100개의 엽절편체에 처리) 때문에 계속해서 실험이 필요하다고 판단된다. 예비시험 결과에 따라, 공동배양후 초기의 선발배지에는 kanamycin은 첨가하지 않고, cefotaxime/carbenicillin (150/150 mg/l)가 첨가된 선발배지에서 배양후, 2일후부터 kanamycin (50mg/l)이 첨가된 선발배지에서 배양 4주이후에 새로운 선발 배지 와 신초증식배지에 계대배양이후 전체 신초재분화를 비교하였다(Table 4-2). 두품종간의 신초재분화율은 'Fuji'가 높은 것으로 나타났으나, 두품종 공히 kanamycin에서의 선발을 2일간 후부터 시작함에 따라 신초의 재분화율은 약 2배가 증가한 30%의 수준이었고, 전체적인 kanamycin 저항성 신초 재분화율도 높게 나타났다.

Table 4-2. The effect of post-selection on shoot regeneration in 'Fuji' and 'Gala' apple transformation.

| 품종 | Post (delayed) selection | 접종절편체수 (%) | 신초재분화수 (%) |
|--------|--------------------------|------------|------------|
| 'Fuji' | 0 ^z | 200 | 32 (16.0) |
| | 2 ^y | 200 | 65 (32.5) |
| 'Gala' | 0 | 200 | 29 (14.5) |
| | 2 | 200 | 56 (28.0) |

^z공동배양배지에 균치상후 바로 kanamycin이 첨가된 선발배지

^y공동배양배지에 균치상후 2일간은 kanamycin이 무첨가배지에서 배양

Agrobacterium 접종후 선발배지에 사용되는 항생제들의 종류와 농도에 따라서 신초 재분화율을 조사 하였다. 현재 형질전환을 하는 많은 실험실에서 다양한 종류의 항생제를 이용하여 공동배양이후 *Agrobacterium*을 없애기 위하여 이용되고 있다. 본 실험에서는 두 strain의 *Agrobacterium*이 항생제에 관한 저항성을 조사한 결과 (Table 4-3), GV3301에 대해서는 500mg /l의 cefotaxime, 500mg/l 의 Calavomox 와 150mg/l + 150mg/l 의 Cefotaxime + Clavamox 의 항생제가 *Agrobacterium*을 완전히 제거 하는데 효과적이었다. 반면에 LBA4404 strain 에 대해서는 GV3301에서 보다 낮은 농도에서 *Agrobacterium*이 제

거가 되었다. 완전하게 *Agrobacterium*을 제거 하면서도 신초 재분화효율을 높이기 위한 항생제의 종류와 적정농도를 규명하기 위하여, LBA4404 *Agrobacterium* strain을 이용하여 재분화가 되는 엽절편체의 비율과 재분화가된 엽절편체의 수를 비교하였다 (Table 4-4). 재분화가 되는 엽절편체의 비율은 항생제의 종류나 농도에 따라서 큰 차이를 보이지 않았다. 하지만 재분화된 엽절편체에서 생기는 신초의 수를 비교 하였을 때는 대부분 항생제의 농도가 높을수록 그 수가 줄어드는 경향을 보였다. LBA4404 *Agrobacterium* strain에서 완벽하게 균을 제거하고 신초재분화율을 높이는 것은 'Fuji' 품종의 경우 250mg/l의 Clavamox (4.9%) 나 150mg/l 의Cefotaxime와 Clavamox 혼용 (4.5%)시 가장 효율적인 것으로 나타났고, 'Gala'의 경우도 비슷한 경향이었으나 150mg/l 의Cefotaxime와 Clavamox 혼용시 4.5%로 가장높게 나타났다.

Table 4-3. The effect of antibiotics on *Agrobacterium* growth.

| 항생제 | 농도 (mg/l) | Bacterial growth* | |
|---------------------|--------------|-------------------|---------|
| | | GV3301 | LBA4404 |
| Control | | + | + |
| | | | |
| Cefotaxime | 250 | ± | - |
| | 500 | - | - |
| | | | |
| Carbenicillin | 500 | ± | - |
| | | | |
| Clavamox | 125 | ± | ± |
| | 250 | ± | - |
| | 500 | - | - |
| | | | |
| Cefotaxime/Clavamox | 100/100 | ± | ± |
| Cefotaxime/Clavamox | 150/150 | - | - |

**Agrobacterium* stain을 YEB 배지에 26°C에서 5일간 성장후 +, growth; ±, growth on streak line; -, no growth.

Table 4-4. The effect of antibiotics on shoot regeneration (%) of 'Fuji' and 'Gala' apple.

| 항생제 | 농도 (mg/l) | 재분화된 엽절편체 (%) | |
|-------------------------|--------------|---------------|------|
| | | Fuji | Gala |
| Control | - | 35.9 | 28.1 |
| Cefotaxime | 250 | 36.4 | 20.8 |
| | 500 | 28.6 | 20.6 |
| Carbenicillin | 500 | 36.5 | 26.5 |
| | 750 | 12.4 | 18.6 |
| Clavamox | 250 | 35.4 | 22.9 |
| | 500 | 25.8 | 29.8 |
| Cefotaxime /Clavamox | 150/150 | 35.1 | 32.7 |

5. *Agrobacterium* 매개법에 의해 'Fuji' 사과에 RNAi vector 도입 및 분석

가. 재료 및 방법

1) 형질전환을 위한 기본식물체의 기내유지 및 증식

형질전환을 위한 기본식물체 유지 및 증식을 위하여 신초의 정단부분 1cm 정도를 잎을 모두 제거하여 배지에 비스듬히 치상하였다. 신초 증식에 사용된 배지로는 Murashige and Skoog(이하 MS)배지에 6-benzyl-amino-purine(이하 BA) 1mg/L, Indol-3-butyric acid(이하 IBA) 0.3mg/L, Gibberelin acid(이하 GA) 0.5mg/L를 혼용하여 Sucrose 30g/L, 한천 8g/L를 첨가하고 pH5.8로 조정하였다. 배양은 형광등아래에 25C로 조절되는 배양실에서 2,000umol • m⁻² • sec⁻¹의 광도로 16h/day 광주기로 하였다.

증식된 신초에서 잎이 3~4장 전개 되었을 때(약 4~6주후) 정단부분을 실험 재료로 사용하였다. 잎을 2~3장정도 붙여서 수직으로 치상하였다.

'Fuji'의 경우에는 기본 MS배지에서 vitamin을 뺀 1/2MS를 기본배지로 하여 stock I 20ml/L에 stock II 20ml/L (Table 4-5)를 혼용하여 Sucrose 15g/L, 한천 8g/L를 첨가하고 pH 5.8로 조정하여 발근을 유도하였다. 'Gala'의 경우에는 잎신장배지 (1/2MS + 2ip + NAA)에 옮겨 잎신장을 유도하였다.

Table 4-5. Rooting medium for gene transformation in apple

| | stock I (×500) | stock II (×50) |
|----------------|----------------|----------------|
| Thiamin-HCl | 25mg/L | |
| Glycine | 500mg/L | |
| Nicotine | 125mg/L | |
| Pyridoxine-HCl | 125mg/L | |
| Myo-inositol | | 2.5g/L |

2) *Agrobacterium* 매개법에 의해 'Fuji'와 'Gala'에 RNAi vector 도입, 선발 및 순화
자가 불화합성 타과를 위한 형질전환에 이용될 4종의 vector (S₁, S₉-RNase hpRNAi for 'Fuji'; S₂, S₅-RNase hpRNAi for 'Gala')는 *Agrobacterium* LBA 4404에 형질전환하여 식물체의 형질전환용 strain을 제작하였다.

LBA4404 배양

50 mg/l 의 Kanamycin이 함유된 YEB 배지에 LBA 4404를 접종후 28℃에서 220rpm으로 24시간 배양하였다. 24시간 배양한 균을 22℃, 4000rpm으로 10분간 원심분리하여 pellet을 SIM배지에 녹였다. 녹은 pellet은 O-D값을 0.7~0.8로 조정하여 균배양액을 만들었다. 이때 균을 희석할 때 쓰는 SIM배지는 citric acid 5.88g/L에 Sucrose 20g/L, Acetosyligone 100μl/L(100mM)과 proline 50μl/L를 첨가하고 pH 5.2로 조정하여 주었다.

LBA 4404의 접종, 공동배양, 선발배양 및 발근

발근배지에서 자란 연한 녹색을 가진 잎을 SIM배지에 담군후, 균 5ml 에 Acetosyligone 100μl/L(100mM)와 proline 50μl/L(1M)를 첨가하여 잎 절편체를 네면 모두 잘라 1차 접종하였다. 공동 배양배지에 기공이 아래로 가도록 치상하였다. 치상 후, 공동배양배지에 있는 잎 절편을 모아 균 배양액에 담그어 22℃, 150rpm으로 10분간 2차 접종을 하였다. 과도한 *Agrobacterium*의 접종을 피하기 위하여 멸균한 킴 와이프스에 절편체를 기공이 아래로 가도록 놓고 약간 건조시켜 준 후, 공동배양 배지(Table 4-6)에 기공이 아래로 가도록 치상하여 암배양 하였다.

균 접종후 3일간 암배양 한후 선발배지로 옮겼다 (Table 4-6). 각 패트리 디쉬당 10개체씩 기공이 위로 가도록 4주간 암배양 하였다. 4주 후, 1주일간 약광에 두었다가 강광으로 옮겨 계속 배양하여 주었고 선발 신초들은 증식을 위해 실험관에 한 개체씩 옮겨 배양하였다. 배양 후 다시 발근배지로 옮겨 발근시켜주었다.

형질전환체의 순화 및 육성

발근된 형질전환체는 발근배지로 이식 4~6주후, 멸균된 모래에 개체를 심고비닐을 씌워 습기가 차면 환기를 시켜 26℃에 5일 순화하였다. 모래에 이식 후 4주 정도가 지나면 plug tray에 멸균한 배양토를 담고 26℃에서 명배양 하였다.

Table 4-6. Co-cultivation medium for gene transformation in apple.

| | 기본 공동배양배지 | 접종후 공동배양배지 | 선발배양배지 |
|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| MS(-vitamin) | 4.4g/l | 4.4g/l | 4.4g/l |
| Myo-inositol | 0.05g/500ml | 0.05g/500ml | 0.05g/500ml |
| Thyamin-HCl | 40mg/500ml | 40mg/500ml | 40mg/500ml |
| Sorbitol | 30g/l | 30g/l | 30g/l |
| IBA ^a | 0.5ml(stock 200ppm) | 0.5ml(stock 200ppm) | 0.5ml(stock 200ppm) |
| Daishin agar | 7g/l | 7g/l | 7g/l |
| Thidiazuron | | 5mg/l | 5mg/l |
| Acetosyligone | | 0.5ml/250ml | |
| Proline | | 0.25ml/250ml | |
| kanamycin | | | 50mg/l |
| cefotaxime | | | 250mg/l |

^a IBA ; indol-3-butyric acid

3) PCR 방법을 이용한 형질전환체 분석 및 육성

사과 잎으로부터 total DNA의 분리는 Peterson 등(1993)의 방법을 다소 변형하여 수행하였다. 약 0.5 g의 어린 사과 엽 조직을 1.5 mL micro centrifuge tube에 넣고 -80°C 초저온 냉동고에서 동결시킨 다음 일회용 tissue grinder로 조직을 파쇄하였다. 이후 0.7 mL의 사과 DNA 추출용 완충용액[DNA extration buffer (0.35 M sorbitol, 0.1M Tris base, 5mM EDTA (pH 7.5): nuclei lysis buffer (0.2 M Tris base, 50 mM EDTA, 2 M NaCl, 2% (w/v) CTAB: 5%(w/v) sarkosyl = 2.5 : 2.5 : 1)]을 가하여 잘 섞은 다음 65°C 수조에서 60분간 반응시켰다. 이후 0.7 mL의 chloroform : isoamyl alcohol (24:1)을 채워 vortex 한 다음 10,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액의 투명한 부분을 2/3배의 isopropanol을 가하여 침전된 DNA를 회수하였다. 회수된 DNA는 RNase를 처리하고 정량한 뒤 농도를 200 ng/μL로 맞춘 후 PCR 반응의 주형으로 이용하였다. 선발된 사과 형질전환 여부를 확인하기 위하여 선발마커인 NPTII 유전자의 증폭을 위하여 primer (5'-gAggCTATTCggCTATgACTg-3')와 primer (5'-ATCgggAgCggCgATACCgTA-3')를 사용하였다. PCR (TaKaRa, TP-600) 조건은 95°C에서 30초, 69°C에서 45초, 72°C에서 1분간 25회 실시하였다. 이후 1.2%(w/v) agarose gel에서 전기영동하고 사진으로 기록하였다.

나. 결과 및 고찰

1)형질전환을 위한 기본식물체의 기내유지 및 증식

4-6주 마다 계속하여 개체증식 및 계대배양을 계속하여 이 연구에서 공시된 'Fuji' 품종이 외에도 'Gala', '감홍'과 '홍로'를 증식하였다. 특히 '감홍'과 '홍로'는 한국에서 육종된 품종으로 형질전환 실험으로 보고된바가 없어 extra 품종으로 실험하였다. '홍로'의 경우에는 다른 품종과 동일한 배양조건하에서는 유리질화 (hyperhydration)이 심하여 증식율이 낮은 것

으로 나타났다. 'Fuji'(A)의 경우는 기내 유지기간이 오래되어 증식율이 떨어져 ethylene억제제 실험을 한후 더 이상 증식하지 않았다. 'Fuji'(B)의 경우 신초증식율이나 재분화율에도 높은 반면 'Gala'의 경우에는 재분화율에서는 '감홍'이나 'Fuji'에 비해서 떨어지는 것으로 나타났다.

Table 4-7. The effect of apple cultivars on shoot propagation and regeneration in tissue culture.

| Genotype | 신초 증식율 (%) (평균±표준오차) | 재분화율 (%) (평균±표준오차) |
|----------|-------------------------|-----------------------|
| 후지(A) | 201.5±21.2 b | ND |
| 후지(B) | 519.0±11.0 a | 70.1±5.1 a |
| 감홍 | 169.0±15.9 bc | 75.5±6.8 a |
| 갈라 | 230.7±18.4 b | 42.9±5.8 b |
| 홍로 | 94.5±49.5 c | ND |

* Values in a column followed by a common letter are not significantly different at the 5% level (Duncan's multiple range test).

* ND; not determined

2) *Agrobacterium* 매개법에 의해 'Fuji'와 'Gala'에 RNAi vector 도입, 선발 및 순화

4종의 (S₁, S₉-RNase hpRNAi for 'Fuji'; S₂, S₅-RNase hpRNAi for 'Gala') RNAi cassette를 LBA 4404 도입후, *Agrobacterium* 매개법을 이용하여 S-genotype에 따른 vector에 따라 각각 약 600개체의 식물체에 형질전환 하였다. 공동배양 배지에 치상후 3일간의 공동배양과 약 5주간의 선발배지에서 암(4주)과 광(1주)상태로 배양하였다. 이후 약 5주동안 새로운 선발배지에서 계대배양을 하고, 4-6주동안의 신초선발 배양을 거치고, 다시 4-6주 동안 발근배지에서 배양하여 완전한 형질전환 식물체를 획득하였다. RNAi를 이용한 사과형질전환에서 'Fuji'는 약 2.6%, 'Gala'는 5.9%의 형질전환율을 보였다(Table 4-8, Fig. 4-17).

Table 4-8. The effect of apple cultivars on shoot regeneration and transformation.

| 품종 | 삽입유전자 | 신초 재분화율(%) | 형질전환율 ¹ (%) |
|------|---------------------|------------|------------------------|
| Fuji | S ₁ RNAi | 20.4 | 2.5 |
| | S ₉ RNAi | 21.9 | 2.6 |
| Gala | S ₂ RNAi | 33.6 | 6.3 |
| | S ₅ RNAi | 34.1 | 5.5 |

¹형질전환율(%) = (NPTII유전자가 확인된 식물체수 / 접종절편체수) X 100

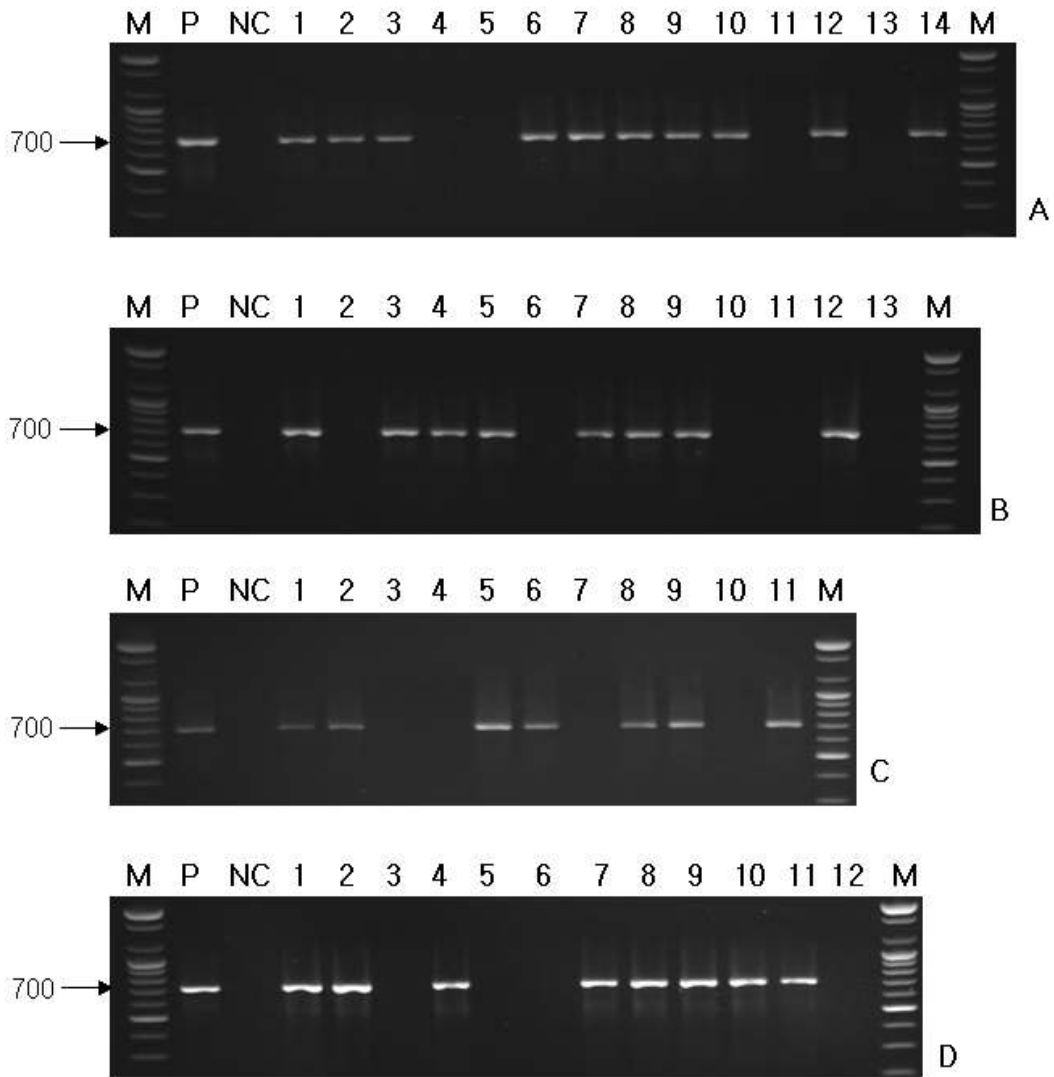


Fig. 4-18. PCR analysis to detect the presence of the *nptII* gene in putative transgenic 'Fuji' (A & B) and 'Gala' (C & D) plants A. The fragment of the *nptII* gene inserted with the S_1 -RNase hpRNAi. B. The fragment of the *nptII* gene inserted with the S_9 -RNase hpRNAi. C. The fragment of the *nptII* gene inserted with the S_2 -RNase hpRNAi. D. The fragment of the *nptII* gene inserted with the S_5 -RNase hpRNAi. M: Size marker, P: Positive control, NC: Negative control

제5절 분자마커를 이용한 무·배추 무사마귀병 저항성 선발마커 개발

1. 배추 뿌리혹병 저항성 선발마커 개발

가. 배추 뿌리혹병 집종법 확립 및 저항성계통과 이병성계통의 선발

본 연구에 사용한 뿌리혹병 균주는 강원도 연천지역에서 수집한 균주로 이 균주의 race를 동정하기 위해 Williams법에 의해 균을 동정하였고, 결과는 아래 표 5-1과 같다. 이러한 결과로 보아 연천균주는 race 4인 것으로 확인이 되었다. 발병정도는 5단계의 발병지수(Disease Index, D.I)로 나누었는데, D.I 1은 병징이 전혀 나타나지 않는 개체, 병징의 진전 정도에 따라 D.I 2에서 D.I 5까지 구분하여 조사하였다. 자사에서 보유하고 있는 배추품종 중 뿌리혹병에 대한 저항성이 가장 강하고 품질이 우수한 품종인 NWCR1을 저항성친으로 선발하였고, 저항성형질을 가지고 있지 않지만 품질이 우수한 'NRB'를 이병성친으로 선발하였다.

표 5-1. 뿌리혹병 판별기주를 이용한 병원균의 race 동정.

| 품종명 | 연천균주 | | | | | | | |
|----------------|-----------|---|---|---|----|----------|-----------|------------|
| | 발병정도(D.I) | | | | | 집종 주수 | 저항성 여부 | Race 판별 |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | |
| CR 하계 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 | 16 | 이병성 | 4 |
| Laurentian | 0 | 0 | 3 | 4 | 9 | 16 | 이병성 | |
| Wilhelmsburger | 0 | 1 | 1 | 3 | 11 | 16 | 이병성 | |
| Jersey Queen | 0 | 1 | 3 | 5 | 7 | 16 | 이병성 | |
| Badger Shipper | 0 | 1 | 2 | 7 | 6 | 16 | 이병성 | |
| NWCR1 | 15 | 1 | 0 | 0 | 0 | 16 | 저항성 | |

세계적으로 배추의 뿌리혹병 저항성 유전자원은 대부분 순무에서 유래하였는데, 그 중 유럽순무 계통인 ECD4가 가장 저항성 수준이 높은 것으로 알려져 있다. 본사에서 육성한 계통인 NWCR1은 병원성이 가장 강한 것으로 알려진 뿌리혹병원균 race4와 11을 집종하였을 때, 순무 계통인 ECD4와 유사한 수준의 저항성을 보였기 때문에 본 연구의 실험재료로 이용하였다. (그림 5-1)



그림 5-1. 배추 뿌리혹병 저항성계통(Left, NWCR1)과 이병성계통(Right, NRB).

나. 저항성 계통과 이병성 계통을 이용한 분리집단 F₂ 육성 및 병 검정

뿌리혹병 병원균 연천균주(race 4, 강원도 연천지역에서 수집한 균주)에 대해서 저항성을 보이는 유럽 순무계통'ECD4'에서 유래된 'NWCR1'과 위의 균에 대해 이병성을 보이는 계통 'NRB'를 교배한 F₁식물체를 자가 수정하여 분리집단 F₂를 육성하였고, 이들 계통과 F₂ 집단에서 뿌리혹병 저항성을 검정하였다 (표 5-2). 양친과 F₁, F₂ 식물체를 비닐하우스의 32공 pot에서 본엽 3~4매 시기에 토양 관주법을 이용하여 뿌리혹병 병원균 race4를 접종하였고, 30일 후 발병 정도를 다섯 단계로 나누어 검정하였다. 즉, 저항성 계통, 이병성 계통, F₁ 그리고 F₂ 분리집단에서 발병정도는 5단계의 발병지수(Disease Index, D.I)로 나누었는데, D.I 1은 병징이 전혀 나타나지 않는 개체, 병징의 진전 정도에 따라 D.I 2에서 D.I 5까지 구분하여 조사하였다. 표 5-3 에서와 같이 F₁에서 병징이 전혀 나타나지 않는 것으로 보아 저항성 유전자가 우성으로 작용하는 것으로 추측할 수 있다. F₂ 분리집단에서는 병징이 전혀 나타나지 않은 저항성 개체와 병징이 조금이라도 나타난 이병성 개체의 비율이 394:91로 나타났다. 이러한 결과로 보아 저항성 형질은 주된 효과를 가지는 하나 또는 2개의 우성 유전자와 여러 개의 미동 유전자에 의하여 조절되는 것으로 추정할 수 있다.

표 5-2. 포장의 토양오염발병 조건에서 배추 F₂ 분리집단의 뿌리혹병 발병조사.

| 발병지수 | NWCR1 | NRB | F ₁ | F ₂ |
|-------|-------|-----|----------------|----------------|
| D.I 1 | 30 | 0 | 60 | 394 |
| D.I 2 | 0 | 0 | 0 | 45 |
| D.I 3 | 0 | 0 | 0 | 11 |
| D.I 4 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| D.I 5 | 0 | 30 | 0 | 32 |
| 합계 | 30 | 30 | 60 | 485 |

다. BSA 기술을 이용한 저항성 연관 분자표지 개발

분리집단 F₂에서 완전한 저항(D.I 1)으로 나온 15개체, 완전한 이병(D.I 5)으로 나온 15개체의 앞에서 DNA를 각각 추출하여 저항성 및 이병성으로 대비되는 DNA를 풀(pool)을 만든 다음, DNA 지문(fingerprinting) 방법을 응용한 BSA(bulked segregant analysis) 기술을 이용하여 뿌리혹병 저항성과 연관된 분자표지를 탐색하였다. 전체 유전자를 분리하기 위해서 1.5ml microtube에 손톱 크기 정도의 샘플과 tungsten bead, DNA 추출 버퍼(0.5M NaCl, 0.5% SDS, 50mM EDTA, 0.1M Tris-Cl) 400 μ l와 2-mercaptoethanol 4 μ l를 넣고 Qiagen사의 grinding machine을 이용하여 곱게 갈아준 후, 10분에 한번씩 샘플을 흔들며 주면서 65 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 식물세포를 용해시켰다. 자석을 이용해 튜브에서 텅스텐 비드를 제거한 후, 5M KOAc 130 μ l를 넣고 가볍게 섞어준 다음 4 $^{\circ}$ C에 10분간 방치하였다. Chloroform:isoamylalcohol(24:1)용액을 400 μ l 첨가한 다음 실온에서 10분 동안 흔들어 준 뒤, 13,000rpm으로 10분간 원심분리 후, 상층액 100 μ l를 새로운 microtube로 옮겼다. 여기에 isopropanol 100 μ l를 넣고 섞어주었다. 실온에 10분 정도 방치하고 13,000rpm에서 2분 원심분리 하였다. 침전물만 남기고 상층액을 모두 버린 후 70% 에탄올 1ml를 넣고 잘 흔들어준 후, 에탄올을 제거하고 침전물을 건조시켰다. 이렇게 분리한 DNA는 RNase가 들어있는 3차 증류수 200 μ l에 잘 녹인 후, PCR 반응의 주형 DNA로 이용하였다.

저항성과 연관된 표지를 선별하기 위해 Operon Technology사에서 구입한 10-mer random primer 720조합, URP 프라이머(universal rice primer) 12조합을 이용하여 BSA-RAPD 방법으로 실험을 수행하였다. RAPD 분석을 위한 중합효소 연쇄반응 조건은 바이오니아 프리믹스 키트(250 μ M dNTP, 10mM Tris-HCl pH8.3, 1.5mM MgCl₂, 40mM KCl 및 1U Taq DNA 중합효소)에 10ng의 DNA를 주형, 25pmol 프라이머를 첨가하여 최종 용량을 20 μ l로 하였다. 이 반응용액을 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하여 변성시킨 다음, 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 37 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 2분간 45회 반복 수행한 후, 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 최종 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 증폭된 산물을 1.5% 아가로오스 겔(agarose gel)에 전기영동하여 반응산물을 확인하였다. URP 프라이머 조합을 이용한 반응의 경우, 모든 조건은 RAPD 분석 조건과 동일하지만, PCR 반응의 온도 조건만 변형하여 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 55 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 2분으로 35회 반복 수행하였다.

실험 결과 PCR 증폭산물 중에 저항성 bulk DNA와 이병성 bulk DNA에서 차이를 보이는 18개의 프라이머 조합을 선별하였고, 이들 프라이머가 재현성 있게 차이를 나타내는지를 확인하기 위해 저항성 친 NWCR1, 이병성 친 NRB 와 저항성 bulk, 이병성 bulk를 이용하여 2차적으로 확인한 결과 재현성이 있는 것으로 나타났다. 이들 18개의 연관표지 중에서 저항성과 가장 가까이 연관된 것으로 추정되는 3개의 분자표지에 대한 결과는 그림 5-2에 나타내었다.

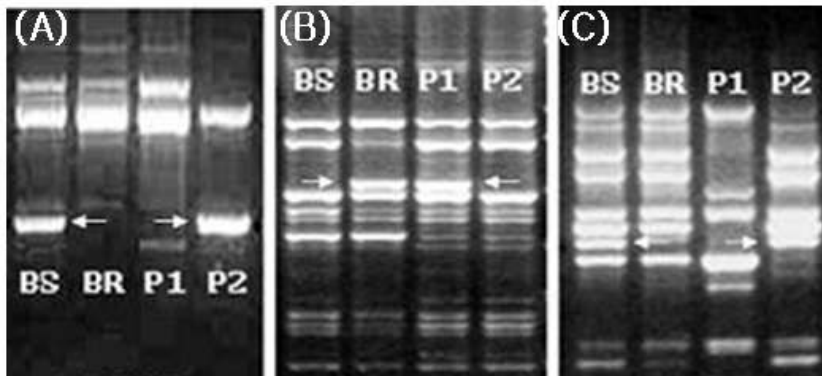


그림 5-2. BSA를 이용한 뿌리혹병 저항성과 연관된 분자표지 탐색.

(P1은 저항성친, P2는 이병성친, BR은 저항성 bulk, BS는 이병성 bulk)

라. 저항성과 연관된 것으로 추정되는 DNA 단편의 SCAR 표지로 전환

BSA-RAPD 실험 결과, PCR 증폭산물 중에 저항성 bulk DNA와 이병성 bulk DNA에서 차이를 보이며 저항성과 가까이 연관된 것으로 추정되는 3개의 프라이머 조합을 선발하였다. 그러나 병 저항성과 연관된 것으로 판명된 세 개의 RAPD 표지는 PCR 조건에 따라 안정적으로 나타나지 않을 수 있어 품종 육종선발에 바로 이용하는 것은 안정적으로 선발함에 있어 어려움이 있기 때문에 분석이 간편한 DNA 표지로 전환하고자 저항성 혹은 이병성과 연관된 것으로 추정되는 DNA 단편을 클로닝하여 염기서열을 분석한 후, 그 표지에 특이적인 프라이머를 다시 합성하여 분석이 간편하고 재현성과 신뢰도가 높은 SCAR(sequence characterized amplified region)표지로 전환하고자 하였다. 저항성 유전자와 비교적 가까이 연관된 것으로 추정되는 세 개의 DNA 단편, NCR06, NCR04, 그리고 NCR92를 아가로오스 겔에서 회수하여 pGEM-T 벡터(Promega사)에 라이게이션(ligation) 하였고, 대장균(DH5α)에 형질전환 하였다. 형질전환된 대장균을 암피실린(ampicillin), X-gal 각각 50μg/ml 함유된 배지에서 12시간 배양하여 형질전환체를 선발하여 플라스미드 DNA를 분리하였다. 분리된 플라스미드를 *EcoRI*로 절단하고 1.4% 아가로오스 겔에서 전기영동을 실시하여 예상되는 크기의 DNA단편이 클로닝된 재조합 클론을 확보하였고, 이들을 마크로젠사에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다. 분석한 염기서열을 기초로 하여 양 말단에 해당하는 염기서열을 근간으로 하는 SCAR 표지의 프라이머를 합성하였다. 이들 프라이머가 재현성 있게 저항성개체와 이병성 개체의 차이를 나타내는지 확인하기 위해 저항성 친 NWCR1, 이병성 친 NRB, 저항성 bulk, 이병성 bulk 내에 속한 각각 8개체를 선택하여 2차적으로 확인한 결과 재현성이 있는 것으로 나타났다(그림 5-3). 이들 표지 중에서 NCR06은 이병성에 특이적으로, NCR04와 NCR92에서는 저항 계통과 이병계통에서 서로 다른 크기의 증폭산물을 확인할 수 있었다. NCR06의 경우 NWCR1과 NRB의 분리집단에서 이병성에 특이적으로 증폭되어지는 표지인자이기 때문에 저항성 형질을 보이지 않는 다른 계통, 즉 NRB가 아닌 다른 이병계통을 이용한 분리집단 육종에서 선발표지로 이용할 경우 중합효소 연쇄반응의 증폭양상을 확인 여부가 문제시 될 수 있다. 이를 보완하기 위하여 DNA Walking *SpeedUp*TM Premix Kit(Seegene사)를 이용하여 DNA 워킹(Walking)을 하였다.

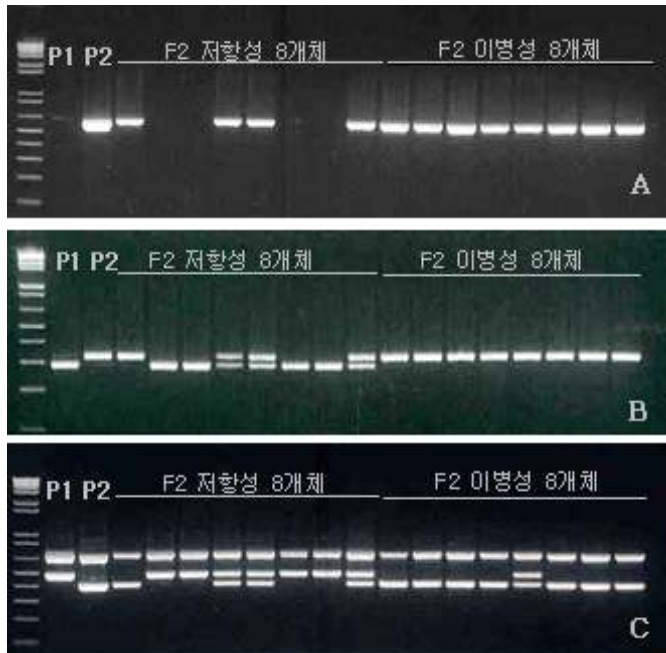


그림 5-3. SCAR로 전환 후 이들 표지를 이용한 양친과 F₂ 개체들의 PCR 검정 결과.
(P1은 저항성친, P2는 이병성친)

DNA 워킹 방법을 이용하기 위하여 이미 알고 있는 NCR06의 염기서열에서 약 100bp 이상의 간격을 두어 5'과 3'방향으로 각각 세 가지 프라이머 (목적 특이 프라이머 1, 2, 3: 06TSP1, 06TSP2, 06TSP3; 제시하지 않음)를 제작하였다. 일차적으로 워킹 kit 내에 온도 조절 프라이머(Annealing Control Primer: ACP™)와 목적 특이 프라이머1(06TSP1)을 이용하여 DNA walking PCR 증폭산물을 얻은 다음, 일차 PCR 반응액 소량을 가지고 두 번째 목적 특이 프라이머2(06TSP2)로 이차 특이 증폭 산물을 얻었다. 또 다시 이차 PCR 반응액을 100배 희석한 후 소량을 취하여 kit 내의 다범위 프라이머(Universal primer)와 목적 특이 프라이머 (06TSP3)를 이용하여 삼차 PCR 반응을 수행하였다. 이렇게 얻어진 증폭산물을 클로닝 후 염기서열을 분석하였다. 그 결과, 기존 영역보다 표지 유전자의 5'부위에서 1kb 남짓한 영역을, 3'부위에서 900bp 남짓한 영역의 염기서열을 분석할 수 있었다. 이들 영역에서 다양한 프라이머를 작성한 뒤, 기존의 프라이머와 함께 저항성, 이병성 bulk DNA로 PCR반응을 수행한 결과, 각각 중합효소 연쇄반응 되면서 저항친과 이병친에서 서로 다른 크기(약 50bp)의 증폭산물을 나타내는 프라이머 조합을 선정할 수 있었고, 저항성 계통에서 증폭된 PCR 증폭산물 또한 클로닝하여 염기 서열을 분석하였다. 이렇게 DNA walking 기술을 이용하여 분석된 이병성계통의 염기서열과 저항계통의 염기서열을 비교한 결과를 이용하여 새로운 프라이머를 작성하여 저항성과의 연관분석을 한 결과, 저항성과 가까이 연관된 것을 확인하였다.

마. SCAR 표지의 저항성 형질과 상관관계 분석

저항성 유전자와 연관된 것으로 추정되는 NCR06, NCR04, 그리고 NCR92 SCAR 표지를 뿌리혹병을 검정한 F₂ 분리집단에서 검정함으로써 실제로 이들 분자표지가 저항성 형질과 얼마나 관련 있는지를 알아보았다. 이들 결과를 요약하여 표 5-3, 5-4, 5-5에 표시하였는데,

이 결과를 기초로 저항성 연관 표지를 이용하여 저항성 수준을 판단할 수 있는 정확성을 계산하였다. 즉, 저항성 계통 NWCR1에서 유래한 대립인자를 R, 이병성 계통 NRB에서 유래한 대립인자를 r로 표현하여 각 연관 표지의 유전자형에 대한 발병지수를 알아보았다. NCR06 표지의 유전자형이 RR인 F₂ 53개체의 평균 발병지수는 1.18으로 나타났고, 유전자형이 Rr인 F₂ 205 개체의 평균 발병지수는 1.26, 유전자형이 rr인 F₂ 72개체의 평균 발병지수는 4.15로 나타났다. NCR04 표지의 경우 유전자형이 RR인 F₂ 53개체의 평균 발병지수는 1.18으로 나타났고, 유전자형이 Rr인 F₂ 205 개체의 평균 발병지수는 1.26, 유전자형이 rr인 F₂ 72개체의 평균 발병지수는 4.15로 나타났으며, NCR92 표지는 유전자형이 RR인 F₂ 55개체의 평균 발병지수는 1.25로 나타났고, 유전자형이 Rr인 F₂ 210 개체의 평균 발병지수는 1.29, 유전자형이 rr인 F₂ 73개체의 평균 발병지수는 3.95로 나타났다. 따라서 뿌리혹병 저항성 계통 선발에 NCR06, NCR04와 그리고 NCR92 표지를 선발표지로 이용할 경우, 저항성 유전자형 RR 과 Rr의 평균 발병지수가 1.3 이내에서 나타남으로서 뿌리혹병 저항성 배추의 선발 표지로 유효하다는 것을 가리키고 있으며 어느 하나의 표지로도 저항성 배추 선발에 이용하는 것이 가능하다는 것을 나타낸다.

표 5-3. 분리집단 F₂ 330개체에 대한 공우성 표지 NCR06 검정 결과.

| 발병지수(D.I) | RR | Rr | rr | Total |
|-----------|----|-----|----|-------|
| 1 | 49 | 180 | 12 | 241 |
| 2 | 2 | 13 | 2 | 17 |
| 3 | 0 | 3 | 2 | 5 |
| 4 | 0 | 1 | 3 | 4 |
| 5 | 2 | 8 | 53 | 63 |
| Total | 53 | 205 | 72 | 330 |

표 5-4. 분리집단 F₂ 330개체에 대한 공우성 표지 NCR04 검정 결과.

| 발병지수(D.I) | RR | Rr | rr | Total |
|-----------|----|-----|----|-------|
| 1 | 49 | 180 | 12 | 241 |
| 2 | 2 | 13 | 2 | 17 |
| 3 | 0 | 3 | 2 | 5 |
| 4 | 0 | 1 | 3 | 4 |
| 5 | 2 | 8 | 53 | 63 |
| Total | 53 | 205 | 72 | 330 |

표 5-5. 분리집단 F₂ 330개체에 대한 공우성 표지 NCR92 검정 결과.

| 발병지수(D.I) | RR | Rr | rr | Total |
|-----------|----|-----|----|-------|
| 1 | 50 | 174 | 16 | 240 |
| 2 | 2 | 13 | 2 | 17 |
| 3 | 0 | 3 | 2 | 5 |
| 4 | 0 | 1 | 3 | 4 |
| 5 | 3 | 9 | 50 | 62 |
| Total | 55 | 200 | 73 | 328 |

마. SCAR 표지의 저항성 형질과 상관관계 분석을 위한 2차 실험

저항성 유전자와 연관된 것으로 추정되는 3개의 분자표지 NCR06, NCR04, 그리고 NCR92와 나머지 15개 표지 ECD2, ECD10, ECD12, ECD14, ECD15, ECD19, ECD20, ECD22, ECD25, ECD29, ECR31, ECR36, ECR37, ECR996, ECRq14를 이용하여 뿌리혹병을 검정한 제2의 F₂ 분리집단 485개체에서 검정함으로써 실제로 이들 분자표지가 저항성 형질과 얼마나 관련 있는지를 알아보았다. 18종류의 표지와 뿌리혹병 저항성 유전자와의 연관 분석을 위하여 F₂ 분리집단을 다시 육성하여 병 검정을 실시하였고, 이들 분리집단과 양친에 대하여 분자표지를 검정함으로써 각 개체의 분자표지 유전형과 병 저항성수준을 조사하였다. 18종류의 표지들을 수치화하여 컴퓨터 프로그램 MAPMAKER/EXP ver.3.0b (Whitehead Institute)을 이용하여 DNA 표지 인자에 대한 배추 뿌리혹병 상호간의 연관 관계를 분석하였다. 그 결과 18종류의 표지 사이의 총 길이는 26.3 cM으로 매우 세밀하게 분포 되었고, 이를 바탕으로 MAPMAKER/QTL ver 1.1b (Whitehead Institute)로 QTL을 분석한 결과 NCR92 표지와 NCR04 사이의 LOD 값 31.35로 매우 높게 나타남으로써 본 연구에서 동정된 QTL은 뿌리혹병 저항성 주동유전자 내지는 주동 QTL로 추정된다. (그림 5-4). 이들 세 종류(NCR06, NCR04, 그리고 NCR92)의 CAPS 표지를 이용하여 새롭게 육성한 F₂ 분리집단에서 검정되어진 결과를 표 5-6, 5-7, 5-8에 표시하였는데, 이 결과를 기초로 저항성 연관 표지를 이용하여 저항성 수준을 판단할 수 있는 정확성을 계산하였다. 즉, 저항성 계통 NWCR1에서 유래한 대립인자를 R, 이병성 계통 NRB에서 유래한 대립인자를 r로 표현하여 각 연관 표지의 유전자형에 대한 발병지수를 알아보았다. NCR06 표지의 유전자형이 RR인 F₂ 122개체의 평균 발병지수는 1.03으로 나타났고, 유전자형인 Rr인 F₂ 244개체의 평균 발병지수는 1.17, 유전자형이 rr인 F₂ 119개체의 평균 발병지수는 2.34로 나타났다. NCR04 표지의 경우 유전자형이 RR인 F₂ 122개체의 평균 발병지수는 1.03으로 나타났고, 유전자형인 Rr인 F₂ 244개체의 평균 발병지수는 1.17, 유전자형이 rr인 F₂ 119개체의 평균 발병지수는 2.34로 나타났으며, NCR92 표지는 유전자형이 RR인 F₂ 122개체의 평균 발병지수는 1.03으로 나타났고, 유전자형이 Rr인 F₂ 243개체의 평균 발병지수는 1.15, 유전자형이 rr인 F₂ 120개체의 평균 발병지수는 2.36로 나타났다. 따라서 뿌리혹병 저항성 계통 선발에 NCR06, NCR04, 그리고 NCR92 표지를 선발표지로 이용할 경우, 저항성 유전자형 RR 과 Rr의 평균 발병지수가 1.2 이내에서 나타남으로 뿌리혹병 저항성 배추의 선발 표지로 아주 유효하다는 것을 나타내고 있으며, 어느 하나의 표지로도 저항성 배추 선발에 이용하는 것이 가능한 것으로 나타났다. 그러나 1차 분리집단에서는 모든 표지에서 유전자형이 rr인 개체의 평균 발

병지수가 4.0 정도로 나타났으나, 이번 검정시험에서는 평균 발병지수가 2.3 정도로 낮게 나타났다. 이러한 결과는 배추 뿌리혹병 저항성의 경우, 환경요인에 의해 새로운 Effect를 가지는 유전자가 관여할 수 있다는 가능성을 유추할 수 있다. 이처럼 환경요인에 의해 영향을 미칠 수 있는 제2의 유전자의 중요성은 무시할 수 없으므로 이 유전자와 연관된 분자표지의 개발에 대한 연구가 필요하다고 판단된다.

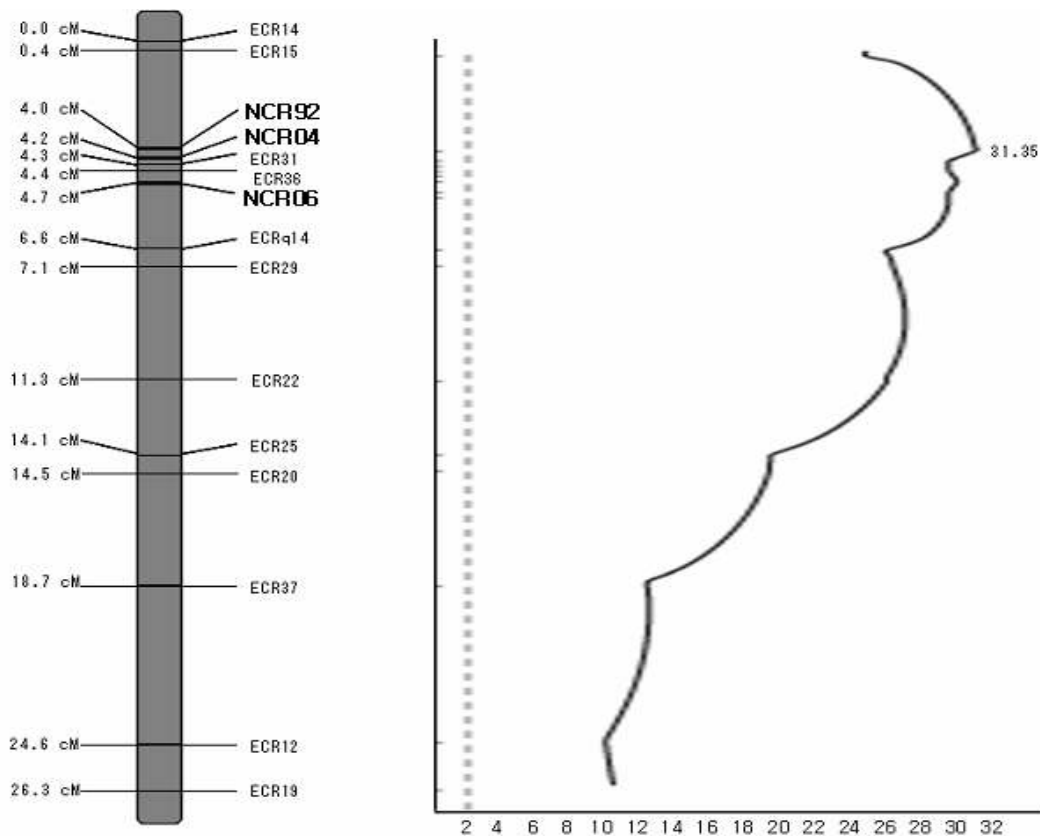


그림 5-4. 배추의 뿌리혹병균 연천균주(race4)에 대한 저항성 유전자와 연관된 분자표지들의 QTL mapping 분석결과.

표 5-6. 분리집단 F₂ 485개체에 대한 공우성 표지 NCR06 검정 결과.

| 발병지수(D.I) | RR | Rr | rr | Total |
|-----------|-----|-----|-----|-------|
| 1 | 119 | 216 | 59 | 394 |
| 2 | 2 | 22 | 21 | 45 |
| 3 | 1 | 2 | 8 | 11 |
| 4 | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 5 | 0 | 3 | 29 | 32 |
| Total | 122 | 244 | 119 | 485 |

표 5-7. 분리집단 F₂ 485개체에 대한 공우성 표지 NCR04 검정 결과.

| 발병지수(D.I) | RR | Rr | rr | Total |
|-----------|-----|-----|-----|-------|
| 1 | 119 | 216 | 59 | 394 |
| 2 | 2 | 22 | 21 | 45 |
| 3 | 1 | 2 | 8 | 11 |
| 4 | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 5 | 0 | 3 | 29 | 32 |
| Total | 122 | 244 | 119 | 485 |

표 5-8. 분리집단 F₂ 485개체에 대한 공우성 표지 NCR92 검정 결과.

| 발병지수(D.I) | RR | Rr | rr | Total |
|-----------|-----|-----|-----|-------|
| 1 | 119 | 216 | 59 | 394 |
| 2 | 2 | 22 | 21 | 45 |
| 3 | 1 | 2 | 8 | 11 |
| 4 | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 5 | 0 | 2 | 30 | 32 |
| Total | 122 | 243 | 120 | 485 |

사. SCAR 표지의 활용에 대한 유용성 검정

위의 실험결과에서 획득된 표지의 활용선발에 대한 유용성 평가를 위하여, 국내에서 판매되는 뿌리혹병 저항성 품종을 포함한 34종의 F₁ 배추 품종과 'NWCR1'에 대하여 뿌리혹병 병원균 연천균주(race 4) 혹은 평창균주(race 11)로 접종한 후, 선발표지를 이용하여 검정하였다. 배추품종으로는 기존에 뿌리혹병균 race 11에 저항성인 것으로 알려진 F₁ 품종 34종을 이용하였다. 상기 34종의 배추 품종과 ECD4, NRB와 NWCR1 은 표 9에 나타내었다.

상기 34 종의 배추 시판 품종과 'NWCR1' 등 기타 품종에 연천균주(race 4) 혹은 평창균주(race 11)로 접종하여 발병여부를 확인하였고, 균주의 접종은 상기에서 기술된 것과 같이 하우스 내에서 실시하였다. 그 결과, 연천균주(race 4)와 평창균주(race 11)의 접종 결과가 달리 나타났다. 평창균주(race 11)의 접종 결과, NRB는 이병성을 보였고, F₁ 저항성 배추 품종으로 알려진 34품종과 NWCR1은 저항성으로 나타났으나, 연천균주(race 4)를 접종한 결과에서는 'NWCR1'을 제외하고는 모두 이병으로 나타났다. 이는 유럽 순무계통에서 유래된 'NWCR1'의 저항성 형질은 기존에 알려진 뿌리혹병 저항성으로 알려진 CR 배추 품종의 저항성과는 다른 저항성 유전자에서 유래되었으며, 기존 뿌리혹병 저항성 배추 품종보다 강한 저항성 형질임을 말해준다. NCR04 표지의 검정 결과, 연천균주(race 4)를 접종하였을 경우, 병 검정 결과와 동일하게 저항성을 나타낸 'NWCR1'계통은 저항성 동형접합 유전자형(RR)

을 나타내었고, 이병성을 나타낸 시판종인 F₁ 배추 품종에서는 이병성 동형집합 유전자형 (rr)을 나타내었다.

표 5-9. 국내 판매용 34 품종과 NWCR1, NRB의 뿌리혹병 및 선발표지 검정.

| 품 종 | 발병여부 | | NCR06 | NCR04 | NCR92 |
|-------------|---------|---------|-------|-------|-------|
| | race 11 | race 04 | | | |
| 1. NWCR1 | 저항성 | 저항성 | RR | RR | RR |
| 2. NRB | 이병성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 3. CR으뜸 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 4. CR맛 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 5. 맞춤 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 6. CR여름맛 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 7. 씹이랑 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 8. CR입춘 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 9. 대통 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 10. 산울림 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 11. 여름맛엇같이 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 12. 우리 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 13. 겨울맛 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 14. 추월 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 15. 신동풍 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 16. 겨울811 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 17. 찐그린 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 18. 진청 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 19. CR동풍 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 20. 불암플러스 | 저항성 | 이병성 | Rr | rr | rr |
| 21. CR청록 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 22. 겨울강풍 | 저항성 | 이병성 | Rr | rr | rr |
| 23. 겨울노랑 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 24. CR명품 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 25. 영웅맛자랑 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | r1r1 |
| 26. 우황CR | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 27. 하대장군 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 28. CR미락쌈 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 29. CR새싹엇같이 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 30. 상장군 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 31. 영광 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 32. 겨울진영 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 33. CR장군 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 34. CR농심 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | rr |
| 35. 겨울여왕 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | r1r1 |
| 36. 동미 | 저항성 | 이병성 | rr | rr | r1r1 |

NCR92 표지는 연천군주(race 4)를 접종하였을 경우, 병 검정 결과와 동일하게 저항성을 나타낸 'NWCR1'계통은 저항성 동형접합 유전자형(RR)을 나타내었고, 이병성을 나타낸 시판중인 F₁ 배추 31품종에서는 이병성 동형접합 유전자형(rr)을 나타내었다. 그러나 나머지 세 품종에 대해서 증폭산물을 나타내지 않아 또 다른 형태의 이병성 동형접합의 유전자형(r1r1)을 가지는 것이 확인되었다. 즉, PCR 반응에서 증폭산물을 나타내지 않은 세 품종에 대해서도 PCR 산물을 나타내는 'NWCR1'의 저항과는 구분되어지는 것을 알 수 있다. NCR06 표지는 연천군주(race 4)를 접종하였을 경우, 'NWCR1'계통은 저항성 동형접합 유전자형(RR)을 나타내었고, 이병성을 나타낸 시판중인 F₁ 배추 품종 중에서 32품종은 이병성 동형접합 유전자형(rr)을 나타내었고, 나머지 두 품종에서는 이형접합 유전자형(Rr)을 나타내었다. 상기의 결과를 종합하면 본 연구에서 개발된 표지는 NWCR1의 뿌리혹병 저항성 형질을 기타 다양한 품종의 이병성 형질과 명확하게 구별할 수 있으므로 뿌리혹병 저항성 개체의 선발을 위한 분자표지로 사용하는데 매우 적합하다는 것을 알 수 있다.

2. 무 뿌리혹병 저항성 연관 선발표지 개발

가. 무 뿌리혹병 접종법 확립 및 저항성계통과 이병성계통의 선발

자사에서 보유하고 있는 무 계통 중 뿌리혹병에 대한 저항성이 가장 강하고 품질이 우수한 계통인 '1917'을 저항성친으로 선발하였고, 저항성형질을 가지고 있지 않지만 품질이 우수한 '2004'를 이병성친으로 선발하였다. (그림 5-5)



그림 5-5. 선발된 무 뿌리혹병 저항성계통(Left, '1917')과 이병성계통(Right, '2004').

나. 분리집단 F₂ 육성 및 병검정

무 뿌리혹병 저항성계통 '1917'을 모계로, 이병성계통 '2004'를 부계(화분친)로 하여 F₁을 육성하였고, F₁ 식물체를 자가수분하여 분리집단인 F₂를 육성하였다. 이렇게 육성한 분리집단에서 각 개체들의 저항성 수준을 판별하기 위해 본엽 4~5매 시기에 뿌리혹병원균 race11(평창군주)을 접종하였다. (표 5-10). 접종방법 및 표현형 조사는 배추와 동일한 방법으로 실시하였다.

저항성계통 20개체, 이병성계통 20개체, F₁ 식물체 20개체, F₂ 식물체 300개체를 접종한 후 45일 후에 뿌리를 관찰하여 저항성 여부를 판별하였다. 표1에서와 같이 저항성계통과 F₁

식물체 20개체 모두 병징이 나타나지 않는 저항성의 표현형을 나타냈고, 이병성계통은 20개체 모두 병징이 심각하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. F₂ 집단에서는 저항성 수준을 좀 더 정확하게 판단하기 위해 4단계로 병징을 나누어 조사하였다. 즉, 병징이 전혀 나타나지 않고 정상적으로 자라는 개체는 Disease Index 1 (D.I 1)로 판별하였고, 병징의 발병 정도에 따라 D.I 2에서 D.I 5까지 구분하여 조사하였다. 그 결과, 병징이 전혀 나타나지 않은 저항성 개체와 병징이 조금이라도 나타난 이병성 개체의 비율이 177:123으로 나타나 정확하게 저항성 유전자의 유전양상을 추측하기는 힘들었다. 그러나 병징이 아주 미약하게 나타난 D.I 2인 42개체를 이병성으로 판단할 경우 9:7(177:123) 비율에 가깝게 나타났고 ($\chi^2=0.867$), D.I 2인 42개체를 저항성으로 판단할 경우 3:1(219:81)의 비율에 가깝게 나타났으므로 ($\chi^2=0.640$), 저항성형질의 유전은 하나의 우성유전자에 의해 조절되거나, 두개의 우성 유전자가 Additive하게 작용하여 나타나는 것으로 추정 할 수 있었다. 이러한 결과를 기초로 하여 분리집단 F₂에서 D.I 1로 나타난 15개체, D.I 5로 나타난 15개체의 DNA를 pooling하여 BSA-RAPD방법으로 저항성과 연관된 분자표지를 선발하는 작업을 시작하였다.

표 5-10. 양친과 F₁, F₂에서의 무 뿌리혹병 접종 결과.

| | '1917' | '2004' | F ₁ plants | F ₂ plants | | | | |
|---------------|--------|--------|-----------------------|-----------------------|----|----|----|----|
| 접종개체수 | 20 | 20 | 20 | 300 | | | | |
| Disease Index | 1 | 5 | 1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 조사개체수 | 20 | 20 | 20 | 177 | 42 | 25 | 20 | 36 |

다. BSA-RAPD 기술을 이용한 연관표지 선발

RAPD random primer 720조합으로 BSA 수행하여 BulkR/BulkS에서 차이를 나타내는 primer 30개를 선발하였고, 이들의 재현성 실험을 수행한 결과 반복적으로 BulkR과 BulkS에서 차이를 나타내는 primer 15개를 선발하였다. 이들 primer는 양친을 이용하여 다시 재검정 하였을 때 저항성 특이적인 primer 4개, 이병성 특이적인 primer 2개를 선발하였고, 이들 primer를 이용하여 F₂에서 연관분석 한 결과, 저항성 유전자와 5cM 이내로 연관된 3개의 표지를 선발하였고 (그림 5-6 ~ 5-11), 이들 표지는 SCAR 표지로 전환하였다.

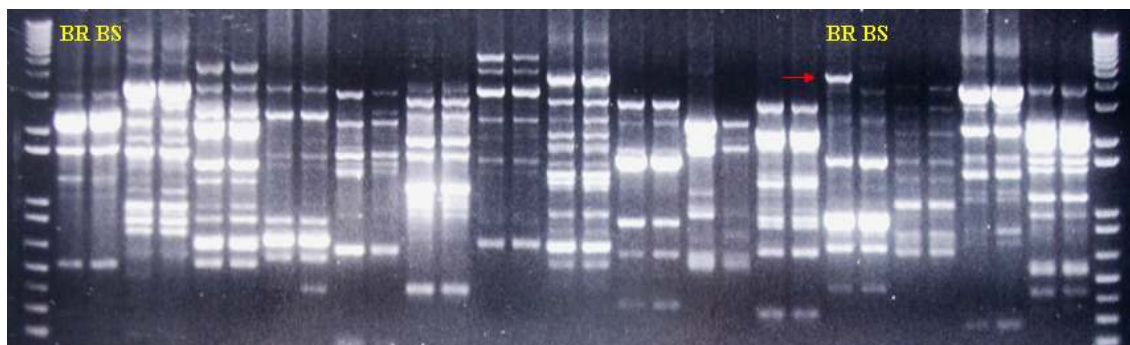


그림 5-6. 무에서 뿌리혹병 저항성 연관 표지 탐색을 위한 BSA-RAPD 분석 결과 1.

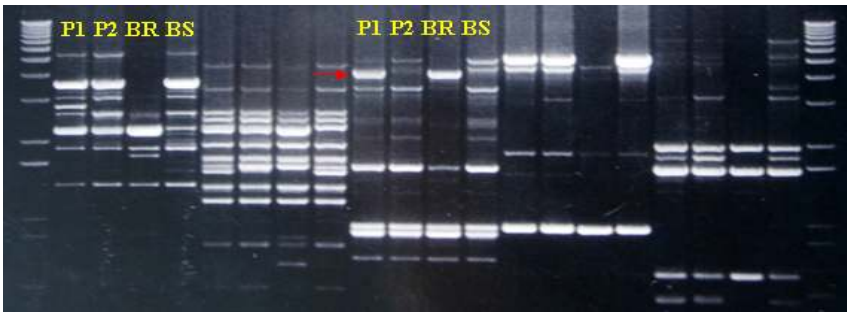


그림 5-7. 무 뿌리혹병 저항성에 연관된 것으로 추정되는 RAPD 표지의 재현성 검정 1.

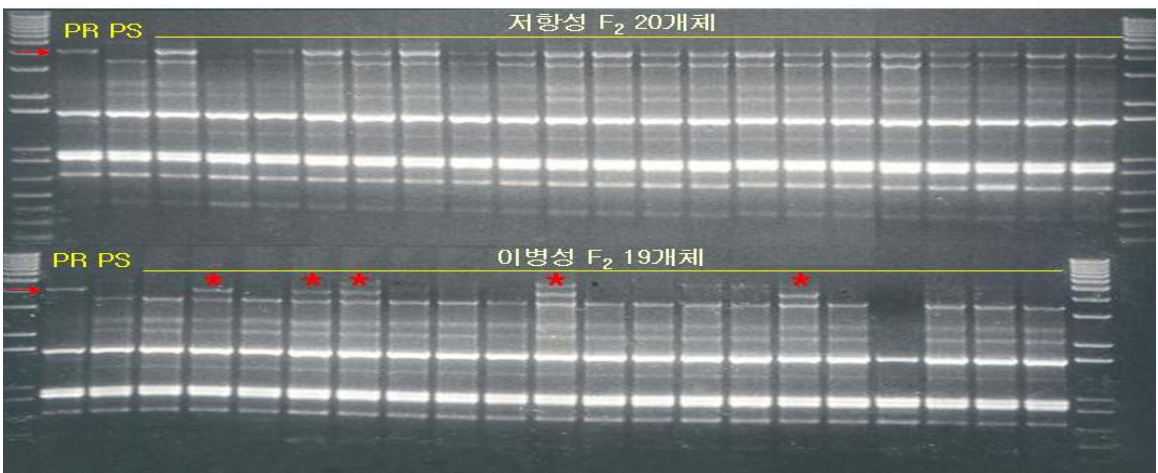


그림 5-8. 무 뿌리혹병 저항성 관련 표지 CR2의 분리집단에서 연관 분석.

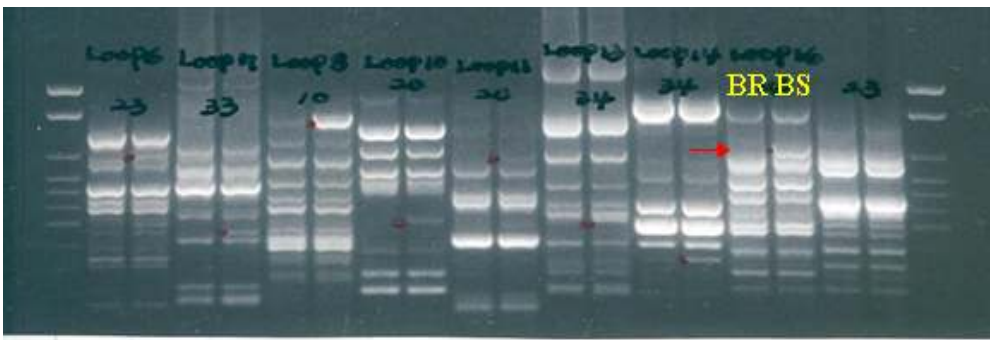


그림 5-9. 무에서 뿌리혹병 저항성 연관 표지 탐색을 위한 BSA-RAPD 분석 결과 2.



그림 5-10. 무 뿌리혹병 저항성에 연관된 RAPD 표지의 재현성 검정 2.

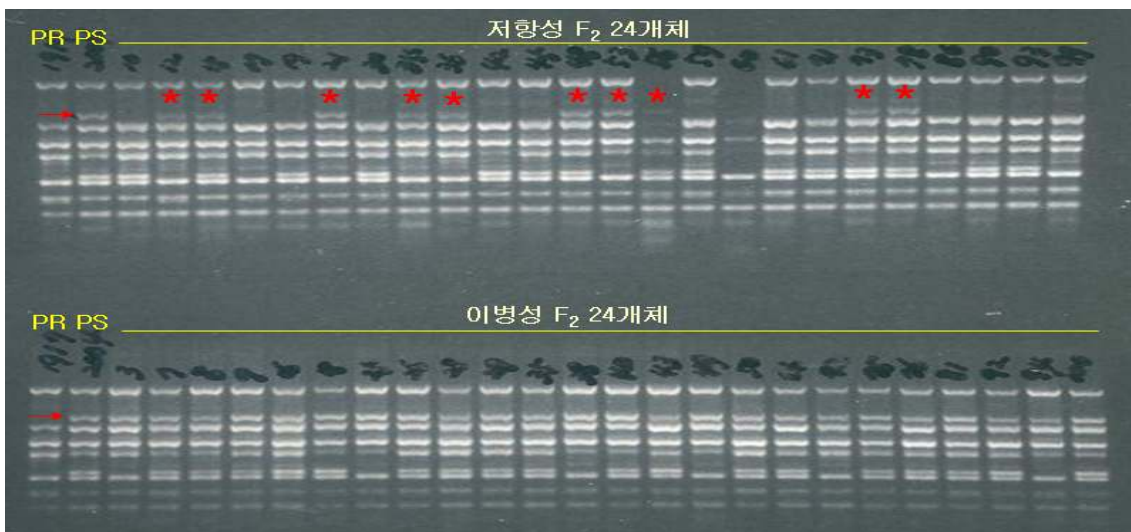


그림 5-11. 무 뿌리혹병 저항성 관련 표지 CRS의 분리집단에서 연관 분석.

라. 선발된 표지의 공우성 SCAR 표지로 전환 및 선발표지로서의 가능성 검정

선발된 3개의 표지는 PCR 반응 후, 저항성에 특이적인 band를 agarose gel에서 elution하여 pGEM-T vector에 cloning하여 염기서열을 분석하였다. 분석한 염기서열을 기초로 하여 저항성 또는 이병성에 특이적인 SCAR 표지로 전환하여 분리집단 F₂ 110개체에서 연관분석을 실시한 결과 (그림 5-12), 3개의 표지 모두 저항성과 아주 밀접한 관련이 있는 것을 확인하였다. (표 5-11) 이들 표지 중에서 저항성유전자와 가장 가까이 연관된 표지는 CR18로, 이 표지 유전자형이 'RR'인 경우 평균 발병지수가 1.09, 'Rr'인 경우 2.28, rr인 경우 4.0으로 나타나, 저항성개체를 선발할 수 있는 효율이 아주 높은 것으로 나타났다. 나머지 2개 표지의 경우에도 CR18과 cosegregation함으로써 저항성과 아주 밀접한 관련이 있는 것으로 확인되었다. 이들 표지를 이용하여 저항성품종 육성을 위해 고정중인 계통에 대해 분석을 한 경우, 실제 저항성수준과 분자표지 유전자형의 상관관계가 아주 높은 것으로 나타나 선발표지로서의 활용가능성이 높은 것으로 나타났다.

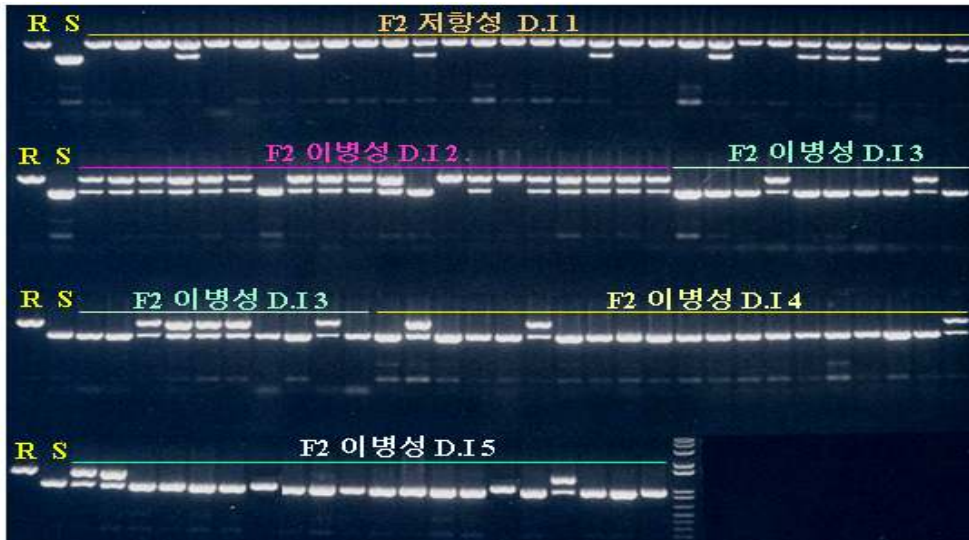


그림 5-12. SCAR로 전환한 표지의 분리집단 F₂에서 연관분석을 실시한 결과.

표 5-11. 뿌리혹병 분리집단 F₂ 110개체에 대한 CR18 표지 분석.

| 발병지수(D.I) | RR | Rr | rr | Total |
|-----------|----|----|----|-------|
| 1 | 21 | 9 | 0 | 30 |
| 2 | 2 | 16 | 2 | 20 |
| 3 | 0 | 7 | 13 | 20 |
| 4 | 0 | 3 | 17 | 20 |
| 5 | 0 | 3 | 17 | 20 |
| Total | 23 | 38 | 49 | 110 |

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 배추 복합내병성 CMS 계통 조기 육성과 그 체계 확립 및 분자표지 인자 개발

1. 목표 달성도

세포질 융성불임성(CMS)을 특정의 계통에 도입하기 위하여는 여교잡을 할 수밖에 없다. 그런데 여교잡은 융성불임성을 도입하려는 특정 계통을 반복친으로하여 세대마다 교잡하고 그 후대 분리집단에서 반복친에 유사한 개체를 선발하는 것이다. 대체로 이 과정을 5-6세대(BC5-BC6)정도 진행하여야 형질이 고정된 계통을 얻을 수 있다. 이러한 여교잡은 매 세대마다 다량의 개체를 성숙기까지 재배하여 특성을 조사하여야 하고 최소한 5-6년이 소요됨으로 경비가 많이 들고 시간이 오래 걸린다.

이러한 문제점을 분자생물학적으로 DNA 마커를 이용하여 해결해 보고자 하였다. 즉 매 세대마다 재배하지 않고 유묘기 때에 AFLP등 분자생물학적 기법으로 반복친에 가까운 개체를 선발하여 후대를 진행시키면 육안으로 반복친에 가까운 개체를 선발하는 것 보다 고정연한을 크게 앞당겨 BC2-BC3세대에서 고정된 계통을 얻을 수 있지 않을까 하는 것이었다. 실험결과 BC3에서 고정된 계통을 얻을 수 있어 이는 100% 목표가 달성된 것이다.

그런데 이용하였던 CMS계통이 배추와 동일 종(*Brassica rapa* spp.)인 소송채라는 식물에서 온 것이었음에도 예상과는 다르게 이미 배추에는 이용 불가능한 것으로 판명된 Ogura CMS로 밝혀졌으며 따라서 속잎에 chlorosis가 생기고 잡종강세현상도 충분히 나타나지 않았다. 배추에서 이용 가능한 CMS를 개발하려던 목적은 달성되지 못하였다. 이 CMS를 처음 만들었던 학자도 후일 이것이 Ogura CMS로 밝혀졌다고 보고하였다. 그러나 배추의 계통에 따라 속잎에 chlorosis가 생기지 않고 잡종강세현상도 충분히 나타날 수 있는 것이 있음을 발견하였다. 따라서 시험전체가 헛된 것은 아니며 1-2년정도 늦게 특정 계통에는 이용 가능한 CMS가 얻어질 것으로 생각되어 목표달성도를 80% 정도로 판단한다. 않고 잡종강세현상도 충분히 나타날 것으로 예상하여 분양받았다.

세 번째 목표는 배추 바이러스병 내병성 품종을 육성하는데 있어 육종효율을 높일 수 있도록 선발용 표지인자를 개발하는 것이었다. 농촌진흥청 배추 genomics 팀이 개발한 SSR 마커를 이용하여 KS-TuMV-3이라고 명명된 표지인자를 찾아내었는데 내병성 인자와의 거리가 2.2cM정도로 밝혀졌다. 현재 특허가 신청되어 심사 중이다. 이는 목표달성도가 100%라고 생각된다.

2. 관련분야에의 기여도

분자마커를 이용하여 여교잡세대를 단축시킬 수 있고 포장에 개체가 성숙할 때까지 재배하지 않아도 반복친과 보다 유사한 개체를 선발할 수 있다는 사실을 밝힌 것은 국내의 경우 이것이 처음이다. 그러나 본 연구의 4년차 말(2007년 11월)에 캐나다에 있는 Landmark사의 전문가를 원예연구소가 초빙하여 세미나를 하였는데 그때 이미 이 회사가 이 기술을 이용하고 있음을 알게 되었다. 그리고 보다 효과적인 방법은 우리가 수행하는 AFLP보다 SSR 또는 SNP 마커를 이용하는 것이라고 하였다. 따라서 본 과제에서도 앞서 이야기한 농촌진흥

청의 SSR 마커를 이용하여 5년차 연구를 수행하고 있는데 효과는 아직 알 수 없는 단계이다. 이처럼 이 기술은 이미 품종육종에서 중요한 위치를 차지하고 있는 단계임으로 이 과제에서 얻은 경험은 모든 작물의 품종육종에 이용될 수 있을 것이다.

배추 바이러스병 내병성 선발용 표지인자는 우리 (주) 바이오브리딩 연구소가 한국종자협회 산하 채소육종 연구소에 공시하고 서비스할 것을 공표한바 있다. 우리나라 배추의 바이러스병 내병성 품종육성에 크게 기여할 것이다.

또한 이 마커는 배추 genomics 팀에서 개발한 유전자지도상의 위치가 확인되어 있으므로 바이러스병 내병성 유전자 자체를 클로닝하는 데에도 유용하게 이용될 것이다.

제2절 Fox-hunting system을 이용한 배추속 작물의 저발현 기능유전자 대량획득 및 육종소재 창성

1. 연구 개발 목표

| 구 분 | 연구 개발 목표 | 연구개발 내용 및 범위 |
|------------------|---|--|
| 1차년도 (2004) | 균질화된 완전장 cDNA 및 FOX-Agrobacterium library 구축 | <ul style="list-style-type: none"> - RNA 조제 및 cDNA 합성 - cDNA의 5'말단 염기배열 결정 - 작제 library의 검토 - Linker ligation 및 PCR에 의한 증폭 - FOX Agrobacteria library의 구축 |
| 2차년도 (2005) | 완전장 cDNA의 염기서열 분석 및 유용유전자의 Genbank 등록 | <ul style="list-style-type: none"> - cDNA의 5' 및 3'말단의 염기서열 결정 - 완전장 cDNA를 염기서열 분석 및 유용 유전자(스트레스 저항성 관련) 등록 |
| 3차년도 (2006) | FOX-Agrobacterium library를 이용한 애기장대의 변이체 선발 및 유전자 기능 해석 | <ul style="list-style-type: none"> - Dipping법에 의해 Arabidopsis에 형질전환 - 자식종자 획득 - 형질 변이체 선발 및 T2 종자 획득 - 변이체로부터 분리된 기능유전자 GenBank 등록 |
| 4차년도 (2007) | 배추의 완전장 cDNA library로부터 ABC transpoter 유전자 분리 및 분자적 특성 | <ul style="list-style-type: none"> - ABC 수송체의 염기서열 분석 및 BlastX 분석 - 아미노산 배열 상동성 비교 및 계통 분석 - Southern blot 및 RT-PCR 분석 |
| 5차년도 (2008) | 배추의 완전장 cDNA library로부터 Bromelain 분리 및 형질 전환 | <ul style="list-style-type: none"> - Bromelain 유전자 cloning - 식물 발현벡터의 구축 - 'Osome' 형질전환체의 작성 - 무름병균 접종 및 발병율 |

2. 연구개발 목표에 대한 달성도

1) 균질화된 완전장 cDNA 및 FOX-Agrobacterium library 구축 (100%달성)

- 2) 완전장 cDNA의 염기서열 분석 및 유용유전자의 Genbank 등록(100% 달성)
- 3) FOX-Agrobacterium library를 이용한 애기장대의 변이체 선발 및 유전자 기능 해석 (100% 달성)
- 4) 배추의 완전장 cDNA library로부터 ABC transpoter 유전자 분리 및 분자적 특성 (100% 달성)
- 5) 배추의 완전장 cDNA library로부터 Bromelain 분리 및 형질전환(100% 달성)

3. 관련분야의 기술발전예의 기여도

- 1) 균질화된 완전장 cDNA 및 FOX-Agrobacterium library 구축
 - 배추의 저발현 기능 유전자의 기능 해석에 활용할 수 있다.
- 2) 완전장 cDNA의 염기서열 분석 및 유용유전자의 Genbank 등록
 - 유전자는 형질전환 실험의 donor gene으로써 활용되어 육종소재를 창출할 수 있다.
 - 배추의 유전자의 기능 해석을 통해 배추재능 연구의 미진한 부분을 도울 수 있다.
- 3) FOX-Agrobacterium library를 이용한 애기장대의 변이체 선발 및 유전자 기능 해석
 - 애기장대의 변이체 선발 기술 및 유전자 기능을 해석 할 수 있다.
 - 중금속 및 내염성, UV 등의 환경스트레스 유전자를 조기에 선발할 수 있다.
- 4) 배추의 완전장 cDNA library로부터 ABC transpoter 유전자 분리 및 분자적 특성
 - ABC transpoter의 기능 분석 및 스트레스 관련 유전자의 후속 실험을 수행할 수 있다.
- 5) 배추의 완전장 cDNA library로부터 Bromelain 분리 및 형질전환
 - 육종 소재로 활용이 가능하며 다른 병 저항성 유전자를 활용하여 내병성 소재를 창성 할 수 있다.
 - 금후, 뿌리 썩음병 및 나방류의 내성에 관한 실험이 진행될 것이다.
 - 형질전환된 배추를 육종소재로 활용하여 내병충성 품종을 육성할 것이며, 단백질 가수분해 효소인 bromelain을 추출하여 사료첨가제, 가축의 유방염 치료제, 항주름 치료제, 각질박리 치료제, 및 보습효과가 탁월한 화장품 첨가제 등에 널리 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

제3절 애기장대 응성불임 변이체를 이용한 임성관련 유전자의 분리 및 이용

1. 연도별 연구목표 및 달성도

본 과제의 최종 연구목표는 1) 확보하고 있는 12종의 EMS 유발 애기장대 응성불임 돌연 변이체로부터 최소한 2-3종의 임성관련 유전자를 확보하고, 2) 애기장대에서 동정된 임성관련 유전자를 이용하여 작물에서의 해당유전자를 탐색하여 그 발현을 조절함으로써 배추의 응성불임성을 인위적으로 유기하는 방안을 모색하는 것이었다. 연구결과 첫 번째 연구목표는 5년간의 본 연구수행으로 *sidecar pollen* 유전자와 *geminipollen3* 유전자를 분리·동정을 완료함으로써 100% 달성하였다. 특히 *sidecar pollen* 유전자에 대해서는 유전자를 분리하는데 그치지 않고, 유전자의 기능분석에 관하여 심화연구를 수행함으로써 후속연구를 위한 많은

중요한 data를 확보하였다고 평가된다. 두 번째 연구목표는 첫 번째에 비해 달성도가 떨어지나, 유전자를 탐색하여 형질전환을 위한 vector를 제작하였으며, 유체의 형질전환을 시도하여 예비적인 결과를 확보함으로써 조만간 형질전환 개체를 확보할 것으로 예상된다. 따라서 80%의 목표달성을 이루었다고 생각된다.

연도별 연구목표 및 달성도는 아래 표와 같다.

| 연차목표 | 연구 내용 | 달성도 |
|---|--|-----|
| 1년차: 웅성불임 변이의 molecular mapping | <ul style="list-style-type: none"> - 연구재료: 8종의 EMS 유발 웅성불임 돌연변이체 - F2 mapping 집단의 형성을 위한 교배 - Molecular marker의 개발 및 제작 - PCR에 의한 SSLP mapping - 전자현미경을 이용한 sectioning, SEM, TEM - Pollen 발달과정의 관찰: staining | 100 |
| 2년차: 웅성불임 유전자의 map-based cloning | <ul style="list-style-type: none"> - 다양한 marker를 이용한 Fine mapping - 돌연변이 발생 부위의 동정 (50-100 kbp) | 100 |
| 3년차: Genetic complementation | <ul style="list-style-type: none"> - BAC를 이용한 백터의 제작 - 애기장대 형질전환: Floral dipping method - 형질전환체의 선발 및 도입유전자 확인:Southern - 형질전환체의 임성회복 조사 - 변이 유전자의 염기서열 분석: 돌연변이 확인 - 변이 유전자의 Knock-out line의 분석 - 변이 유전자의 구성: Southern - 변이 유전자의 발현양상: RT-PCR, Northern | 100 |
| 4년차: 애기장대/배추의 임성관련 유전자의 동정및 탐색 | <ul style="list-style-type: none"> - 고밀도 유전자지도 작성과 knock-out 삽입계통의 표현형 분석을 통한 <i>gem3</i> 및 <i>scp</i> 유전자의 분리 및 동정 - 애기장대 <i>gem3</i> 및 <i>scp</i> 유전자의 배추과 작물의 homolog의 탐색 및 유전자 cloning - AOS RNAi vector를 이용한 애기장대, 배추과 작물(유채 등)의 형질전환체 육성 | 100 |
| 5년차: 배추의 웅성불임성의 유기 | <ul style="list-style-type: none"> - RNAi 백터를 이용한 배추의 형질전환 - 배추 형질전환체의 선발 및 도입유전자의 확인 - 형질전환체의 임성 분석 - 배추과 작물의 임성조절가능한 웅성불임개체 확보 및 1대 잡종 종자생산 체계의 확립 | 80 |

2. 관련분야의 기여도

본 과제의 연구결과들은 당초 목표한 세부 연구목표들이 평균 80%를 달성하였으며, 특히 2종의 애기장대 임성관련 유전자 정보를 확보하였다. 또한 임성조절 가능 웅성불임 변이체

의 육성하여 잡종종자 생산에 이용 가능성을 제시함으로써, 주곡작물 벼와 배추등의 채소작물 품종육성분야에서 가장 취약한 분야인 1대 잡종종자 생산 분야에 생명공학적인 방법으로 접근할 수 있게 되었다. 즉 서로 상반되는 2개의 기능(불임유발/임성회복)을 가지는 새로운 계통 육성을 위한 초석을 다지는 등 관련분야 연구발전에 상당부분 기여하였다. 향후 작물을 대상으로 1대 잡종종자 생산에 본 연구로 통하여 확보된 유전자와 음성불임 계통의 활용 가능성을 철저히 검증하고, 새롭게 대두되는 문제점들을 계속된 추가 연구를 통하여 하나 하나 보완해야한다고 생각된다.

제4절 S-RNase 유전자의 RNA interference 방법에 의한 자가화합성 사과 계통 육성

본 연구의 최종 목표는 우리나라 사과의 주품종인 'Fuji' (S₁S₉)에 S-alleles의 RNAi법을 이용하여 자가결실성인 'Fuji'를 개발하기 위함이다. 사과의 주두에서 발현하는 S₁- 및 S₉-RNase를 cloning하여 염기서열을 분석하고 pK7GWIWg2(II) vector를 이용하여 intron hairpin RNA(ihRNA)를 형성하게 함으로써 효율적인 gene silencing이 일어날 수 있도록 **vector를 구축 확인** 한다. 또한 형질전환 실험을 위하여 공시재료를 기내도입, 유지 증식하며 이를 이용하여 사과의 형질전환시 가장문제가 되는 **형질전환율에 미치는 요인을 구명** 하도록 한다. 이를 위하여 ethylene 억제제의 이용, *Agrobacterium tumerfaciens*의 strain, post-selection 및 항생제의 농도 및 종류들이 형질전환율 향상에 어떠한 영향을 미치는지 구명한다. *Agrobacterium* 매개법에 의해 주 공시재료인 'Fuji'와 비교품종인 'Gala'에 제작된 RNAi vector 도입, 선발 및 순화 후 **형질전환체를 분석 육성**하도록 한다.

1. 고효율적 S-RNase gene silencing을 위한 RNAi vector 구축

고효율적인 RNAi vector를 구축하기 위하여, 먼저 'Fuji'와 'Gala'와 'Fuji' 두 품종의 풍선기 상태의 꽃을 채집한 후 암술을 분리하여, 각 품종의 S-allele specific primer와 cDNA를 이용하여 'Fuji'에서 S₁-, S₉-RNase 'Gala'에서 S₂-, S₅-RNase를 Cloning 하였다. pK7GWIWg2(II) vector를 이용하여 목적하는 유전자인 4종의 S-RNase를 vector에 삽입하고 intron을 이용한 intron hairpin RNA(ihRNA)를 형성하게 함으로써 효율적인 gene silencing이 일어날 수 있도록 4종의 vector를 구축하고 각 vector의 sence와 antisence의 일부분을 증폭하고 sequence후 삽입여부를 확인하였다. 이상의 세부목표에 수치로는 100%로 달성하였다고 판단된다.

과수류에서 국내 처음으로 시도된 RNAi 기술개발은 타과수류 포도, 복숭아 등에서도 gene function을 밝혀내거나, virus 내병성 van종 육종 등 여러 목적에 적용될 수 있다. 또한 형질전환후 mRNA 전사시 목적유전자가 hairpin RNAi 구조를 형성하기 위하여 각 S-RNase 유전자 단편을 sence 방향과 antisence 방향으로 삽입되게 하고 이들의 중간부분에 애기장대의 intron이 위치하도록한 pK7GWIWg2(II) vector의 이용은 RNAi를 이용한 고효율 gene silencing에 유용하게 적용될 수 있다. 이는 RNAi를 이용한 타 연구에 vector 개발의 기초 자료로 이용될수 있다.

2. 사과에서의 형질전환효율성 향상을 위한 요인 분석

형질전환 효율에 미치는 요인들을 구명하기 위하여 공시재료를 기내도입, 유지 증식하며, 이를 이용하여 사과의 형질전환시 Ethylene 억제제의 이용, *Agrobacterium tumerfaciens*의 strain, post-selection 및 항생제의 농도 및 종류들이 형질전환율 향상에 어떠한 영향을 미치는지 구명하였다. 이상의 세부목표에 수치로는 100%로 달성하였다고 판단된다.

사과 형질전환시 가장 문제가 되는 낮은 형질전환율 향상에 필요한 요인을 분석한 실험은 앞으로 사과 형질전환에 필요한 주요한 기술로 이용될 수 있다. 공동배양 기간동안의 ethylene 억제제의 효과적인 처리를 통하여 *Agrobacterium*의 infection율과 신초 재분화를 높일 수 있어 사과뿐만 아니라 타과수류의 형질전환실험에도 적용할수 있다. 또한 공동배양 후 *Agrobacterium* 제거에 필요한 항생제의 농도와 종류 및 post selection을 이용한 형질전환율 향상은 형질전환을 통한 분자유종기술로 이용될 수 있다.

3. *Agrobacterium* 매개법에 의해 'Fuji' 사과에 RNAi vector 도입 및 분석

자가 불화합성 타과를 위한 형질전환에 이용될 4종의 vector (S_1 , S_9 -RNase hpRNAi for 'Fuji'; S_2 , S_5 -RNase hpRNAi for 'Gala')는 *Agrobacterium* LBA 4404에 형질전환하여 식물체의 형질전환용 strain을 제작하였다. LBA 4404의 접종, 공동배양 및 선발배양은 기존의 방법과 본 실험에서 구명된 방법 등을 이용하였다. *Agrobacterium* 매개법에 의해 S-RNase RNAi 유전자가 도입된 형질전환체를 PCR 분석하였고 이를 육성중이다. 개화이후의 자가화합성의 표현형에 대한 검토는 시간이 조금 더 요구된다. 이는 순화후 사과의 개화시기까지가 3-4년정도의 시간이 소요되기 때문이다. 이상의 세부목표에 수치로는 90% 정도로 달성하였다고 판단된다.

우리나라 사과의 주품종인 'Fuji' 에 S-alleles의 RNAi법을 이용하여 자가결실성인 'Fuji' 사과의 형질전환체는 타과수류에서 이용되는 것과 마찬가지로 자가결실성 품종육성에 교배친으로 이용될 수 있다. 사과에 있어서 자가결실성 품종의 개발은 인공수분에 따르는 노동력, 경비절감과 더불어 개화기의 기상이변 및 환경오염 등의 불안정한 환경에서도 안정적인 생산을 가능하게 할 수 있다.

제5절 분자마커를 이용한 무·배추 무사마귀병 저항성 선발 마커 개발

1. 연구개발목표의 달성도

무의 경우, 저항성과 연관된 6개의 표지를 개발하였으며, 이 중 2개는 공우성 SCAR 표지로, 나머지 1개는 우성 SCAR 표지로 전환하였음. 이들 표지중에서 저항성유전자와 가장 가까이 연관된 표지는 CR18로, 이 표지 유전자형이 'RR'인 경우 평균 발병지수가 1.09, 'Rr'인 경우 2.28, rr인 경우 4.0으로 나타나, 저항성개체를 선발할 수 있는 효율이 아주 높은 것으로 나타남. 배추의 경우, 저항성과 연관된 3개의 표지를 개발하여 공우성 CAPS 표지로 전환하였음. 이들 표지 중에서 저항성유전자와 가장 가까이 연관된 표지는 NCR06으로, 이

표지의 유전자형이 'RR'인 F₂ 53개체의 평균 발병지수는 1.18로 나타났고, 유전자형이 Rr인 F₂ 205 개체의 평균 발병지수는 1.26, 유전자형이 rr인 F₂ 72개체의 평균 발병지수는 4.15로 나타나, 저항성개체를 선발할 수 있는 효율이 높은 것으로 나타남. 이상의 연구결과로 보아 당초 목표에 대비하여 목표를 100% 달성하였다고 판단됨.

2. 관련분야의 기술발전예의 기여도

본 과제를 통하여 개발된 뿌리혹병 저항성 연관 분자표지를 이용하여 무와 배추에서 뿌리혹병에 대하여 저항성을 나타내는 계통을 선발하여, 최종적으로는 종자경쟁력이 우수한 뿌리혹병 저항성 품종을 육성하고 있는 중이다. 특히 배추 뿌리혹병저항성과 연관된 분자표지를 이용한 육성방법은 특허출원을 하였고, 이를 계기로 타 종묘회사와 차별화된 고품질의 품종을 육성하여 판매할 수 있는 초석을 마련하였다고 판단된다. 이러한 분자표지를 이용한 선발 (Marker Assisted Selection) 기술을 체계화함으로써, 이 기술의 이용에 따른 다른 작물에서의 분자표지 기술의 활성화를 유도할 수 있을 것이다.

또한 본 연구결과는 십자화과 작물에서 중요한 뿌리혹병 저항성 형질의 유전양상을 알 수 있으며, 이러한 형질과 연관된 분자표지들을 활용할 경우, 저항성 개체를 유묘기에 효율적으로 선발함으로써 국내 채소품종의 국제경쟁력을 제고할 뿐 아니라, 관련업계의 품종육성 기술의 비약적인 발전을 초래하여 채소종자의 부가가치를 높일 수 있으리라 판단된다. 본 과제에서 수행한 연구방법이나 결과는 타 작물에서의 연구수행을 위한 기초자료로 사용될 수 있을 뿐 아니라 연구결과를 활용한 신품종 육성 또는 저항성 유전자를 분리할 수 있는 기초 자료로도 제공될 수 있을 것이다.

제5장 연구개발 결과의 활용계획

제1절 배추 복합내병성 CMS 계통 조기 육성과 그 체계 확립 및 분자표지 인자 개발

1. 추가연구의 필요성

분자마커를 이용하여 여교잡 세대를 단축시킬 수 있다는 사실은 이미 전 세계적으로 공인된 기술인 것 같다. 문제는 비용이다. 앞에서 예로 든 Landmark 사와 한국에 채소육종연구소를 가진 Monsanto 사 및 Singenta 사의 경우(세미나 및 소문) 검정하는 점당 비용이 30센트(420원) 이하로 알려지고 있다. 그런데 우리는 이 과제를 수행하면서 소요된 비용을 보면 최소한 점당 일만오천원(약 10불)정도인 것 같다. 왜 이렇게 비용의 차이가 크게 생기는지 잘 이해하고 있는 학자가 없는 것 같다. 식물 육종의 국제경쟁력을 확보를 위해 비용절감을 위한 후속 연구가 절실한 실정이다.

2. 기업화 추진 방안

본 과제를 수행한 (주)바이오브리딩 연구소는 배무채, 배추 등의 육종을 전문으로 하는 중소기업체이다. 본 과제를 통해 개발된(경험한) 분자표지를 이용한 여교잡의 세대단축 기술은 현재도 위 두 작물의 세포질 융성불임성 계통 육성, 특히 형질의 도입을 위한 육종연구에 활용되고 있다. 누구나 원하면 그 수행요령을 전달할 수 있을 것이다.

배추 바이러스병 내병성 선발용 마커 역시 자체로 다양한 재료에 이용하고 있다. 즉 내병성 재료의 탐색, 우량 계통 육성 때 내병성 유무 확인 등에 이용하고 있다. 그리고 위에서 이미 기술한바와 같이 국내 모든 배추 육종회사에 홍보하여 이용하도록 조치 하였다.

제2절 Fox-hunting system을 이용한 배추속 작물의 저발현 기능유전자 대량획득 및 육종소재 창성

1. 기대효과

○ 중국에서 요구하는 만추대, 내병성, 내서성, 고품질의 품종 개발이 가능할 것이다. 국내 종자산업 규모는 2,000만 불 정도이지만 거대한 중국, 인도 등 아시아권의 종자시장이 20억 불 이상 신장할 것으로 예측되며 배추, 무의 수요는 서남아, 북미, 유럽시장에서도 급신장 추세이다 이러한 종자시장에 종자 수출용 품종개발의 기술적 우위를 확보할 수 있음

○ 저항성 및 내재해성 품종개발의 육성재료 및 기술축적으로 품종개발이 가속화 될 것임

2. 활용방안

○ 배추 분자 육종 기술 체계 확립을 위한 기초 인프라 구축 (정보 축적 및 이용, 개발 서비스 등)

○ 대량의 분자 마커 발굴 및 다양한 유전자원 및 집단 확보를 통한 배추 육종의 효율화 기반 확립

○ 배추의 표준 고밀도 유전자지도 작성을 통해 목표 형질 관련 유전자좌들의 효율적 탐색 도
모

- 맞춤형 품종 개발의 가능성
- 유전체 정보를 이용한 대용량의 분자 마커 개발 시스템의 모델로서 역할
- 육종가와 연계한 유용형질 분자표지 개발 가능
- 국제 배추 계통 염기서열 분석을 위한 기초 자료 제공
- 유효 성분 정량 측정 매뉴얼의 구축을 통한 정량 분석의 활성화와 기능성 관련 마커 개발
- 증대된 기능성 성분함유 육종을 통한 명품 배추 생산
- 기능성 성분의 조절기작의 새로운 연구

제3절 애기장대 응성불임 변이체를 이용한 임성관련 유전자의 분리 및 이용

1. 추가연구의 필요성

가. 본 연구에서 대상으로 하는 Arabidopsis의 응성불임 돌연변이체를 이용한 임성관련 유전자의 분리 및 특성규명에 관 한 보고는 본 과제의 책임자가 아는 한 현재까지 거의 없 는 실정이므로, 본 과제를 수행함으로써 이 분야의 연구가 국내에서 활성화되는 계기가 될 것으로 생각된다.

나. 본 연구에 사용될 예정인 8종의 응성불임 돌연변이체는 본 과제의 책임자가 직접 선 발한 것으로 아직 외국의 연구자들에게 분양된 바가 없으며, EMS에 의해 유발된 돌연변이 체이므로 연구결과를 국제적으로 저명한 학술지에 게재 될 가능성이 높다고 평가된다. Arabidopsis의 생식기관에 관한 연구가 국제적으로 매우 활발하고 연구자들 간의 경쟁 또한 치열한 현재의 상황에서, 모든 연구자들이 Arabidopsis 종자은행으로부터 쉽게 분양받을 수 있는 T-DNA tagging에 의한 응성불임 돌연변이체는 이미 다른 연구자들에 의해 연구 중 이거나 연구가 종료되었을 가능성이 높다고 생각된다.

다. EMS에 의한 변이가 아직까지도 유전자의 분리하기 위해 오랜 시간(대략 12 개월 이 상)에 소요된다 할지라도, single base pair change를 유발하는 특성상 광범위한 spectrum의 돌연변이체를 유발하므로 유용한 응성불임 돌연변이체를 선발할 가능성이 매우 크다고 할 수 있다.

라. 본 과제는 5년 연구수행으로 인해 농산업분야에 활용가치가 높은 많은 기초연구 data 를 확보하였다. 위에서 기술된 연구결과에서 알 수 있듯이 본 연구 과제는 다양한 construct 의 제작과 각각의 형질전환체 선발과정을 수반한다. 또한, 이들 중 다수는 선발된 형질전환 체를 다른 construct로 재 형질전환 혹은 교배하는 작업이 요구된다. 많은 개체들의 경우 T2/T3 세대까지 관찰이 요구됨으로 비교적 짧은 생장 주기를 가지는 애기장대를 주 대상 식물로 함에도 불구하고, 추가연구의 필요성이 있다.

마. 또한 애기장대의 SCP 유전자 연구결과를 바탕으로, 작물의 응성배우체 임성 조절가능 성에 대한 연구를 실행하게 될 것이다. 본 연구진의 작물연구대상인 애기장대와 가장 유전 적으로 가까운 배추 유채 등을 우선순위로 하며, 이는 형질전환기술이 국내 기술진에 의해 어느 정도 확립되어 있으며, 또한 농업적 응용가치가 높으므로, 이를 위하여 해당 작물의 조

직배양기간과 생장주기를 고려할 때 추가연구를 위한 지원이 필요하다.

바. 또한 애기장대의 화분을 이용한 연구자의 전문적 경험과 그 연구결과를 바로 농업적 실용가치 창조로의 효과적인 접목을 피하기 다년간 지원됨으로써 기초연구의 실용화를 위해 필수적인 연구를 가능하게 할 것이다.

2. 타 연구에의 응용

가. 신청과제와 관련한 연구 분야의 국내연구진은 거의 전무하다고 할 수 있다. 따라서 연구결과를 국제 학술계에서 주목받는 논문으로 발표함으로써, 식물분자발생학 등 관련분야의 국내 자생 연구력을 유지, 양성하는 데 기여할 것이 분명하다. 특히 식물발생학 분야는 외국에서도 연구인력이 그렇게 많지 않으며, 일부 몇몇 연구그룹이 이 분야를 선도하고 있는 실정이다. 본 연구에서 주요한 업적의 하나인 sidecar pollen 돌연변이체는 1996년 미국의 버클리대학의 그룹에 의해 최초로 보고된 애기장대에서 최초의 웅성배우자 돌연변이체로서, 지난 12년 동안 유전자가 규명되지 않았으나, 본 연구수행으로 인해 그 유전자가 밝혀지게 되었다. 따라서 이 연구결과를 저명한 국제학술잡지에 발표함으로써 국내연구진도 이 분야의 선두그룹에 진입할 수 있는 계기가 마련되었으며, 결과가 순수 식물학 분야에도 아래와 같이 응용될 수 있으리라 기대된다.

나. 종자식물의 웅성배우자 형성의 세포운명 결정과 그 분화과정을 조절하는 분자 network를 밝힘으로써, 다른 생물 중 - *C.elegans*, 초파리 등에서 밝혀지고 있는 세포운명 결정 기작과 비교 연구를 가능하게 하는 학문적 기대효과가 매우 크다. 현재 관련학계에서의 가장 큰 관심사중의 하나인 '식물의 비대칭성 소포자분열의 방추체 위치/방향 결정과 조절'에 대한 구체적인 해답을 얻을 수 있을 것이다.

다. SCP와 그 반응 단백질을 이용하여 제1 화분유사분열의 분열축을 조작함으로써 중요한 농작물의 웅성불임개체를 유발하는 기술 개발의 기초자료로도 활용 할 수 있으므로, 잠재적인 농업적 활용도(생명공학적 방법을 이용한 작물육종분야)가 크다.

라. 웅성배우자성 유전자와 비대칭성 소포자 세포분열에 관련하여 본 연구자는 다년간에 걸쳐 활발한 국제적 연구교류를 통하여, 꾸준히 연구결과들을 발표하여 왔다. 지금까지의 선행 결과들을 사장하지 않고, 본 신청과제를 통하여 심화하고 나아가서 국내외적으로 관련연구에서의 선도적 위치를 계속 유지 발전시킬 수 있을 것이다. 또한 상당부분 실현성이 타진된 선행연구들은 본 과제 수행을 통한 심화연구로 이어 질 경우 국제적으로 저명한 학술지에 게재될 것으로 확신하며, 확보될 소포자 특이적인 유전자들에 대해서는 유전자 특허출원도 가능할 것으로 사료된다.

마. 본 연구 수행을 통해 연구원 및 대학원생들이 향후 식물학의 여러 분야를 연구하는데 필요한 유전학적, 분자생물학적 그리고 식물 발달생물학적인 접근 방법들을 배우고 익힘으로써 인적 자원 양성 효과도 기대할 수 있다.

3. 금후의 활용

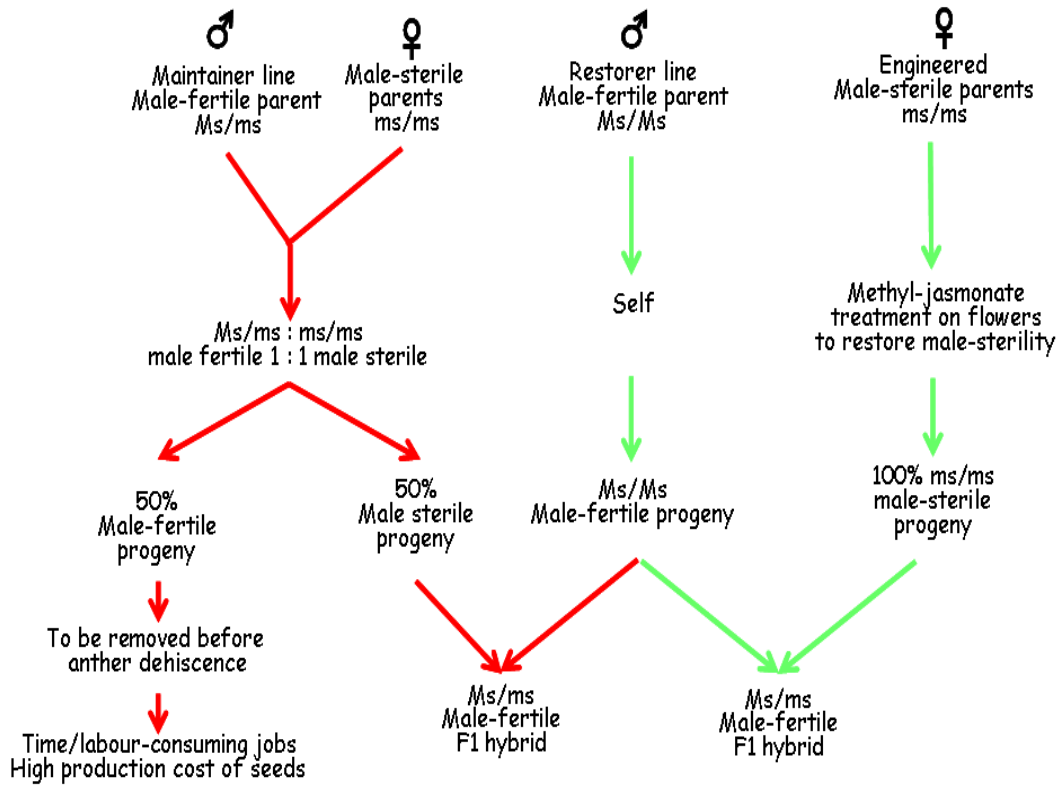


그림 3-28. 1대 잡종종자 생산을 위한 유지친, 불임친, 회복친을 이용한 3계통법과
임성조적 가능한 불임친, 회복친 만을 이용한 2계통법의 비교.

가. 본 연구과제에서는 옹성불임 유전자를 단지 클로닝하여 특성을 규명하는 기초연구에 그치지 않고, 획득한 유전자들을 작물에 적용하여 1대 잡종종자를 생산과정에 이용가능성을 적극 타진할 것이다. 또한 불임유발 유전자와 제초제 저항성 유전자를 링크한 벡터를 제작하여 이용가능성을 타진함으로써 실제 채소작물의 포장에서 1대 잡종 종자의 채종과정에 실제적으로 이용될 수 있는 방안을 적극 모색할 예정이다.

나. 그림 3-29에서 보는 바와 같이 JA생합성 경로에 관여하는 AOS 유전자를 화분과 같은 특정기관에서만 발현을 억제하고, 임성회복이 필요한 개체에 포장에서 자스몬산을 살포함으로써 종자의 확보가 가능할 것으로 생각된다. 이러한 방법을 통하여 유지친이 필요치 않는 불임친, 회복친만을 사용하여 1대 잡종종자를 생산하는 2계통법이 가능할 것으로 생각된다. 특히 상업성이 높은 채소작물을 대상으로 그 활용가능성이 매우 크다. 우리나라 주요한 채소의 하나인 배추의 경우, 애기장대와 유전자구성이 매우 유사하고 유전적으로 근연종이므로 애기장대의 유전자 발현조절시스템이 동일하게 작동될 가능성이 매우 높으므로 1대 잡종종자 생산을 위한 옹성불임개체 유기에 활용할 계획이다.

다. 대표적인 자가수정 작물인 벼의 경우에도 활용가능할 것으로 판단된다. 1대 잡종 육종 기술은 수량성을 크게 증가시킬 수 있는 잠재력은 있으나 종자생산의 어려움 등 아직 육종적으로 해결되어야 할 문제가 많이 있다. 특히 Indica x Japonica 1대잡종의 경우 영양생장기의 잡종강세 효과는 매우 크지만, 출수지연과 불임 등의 문제가 있어 실용화되지 못하고

있는 실정이다. 현재 중국에서는 또한 불임친, 유지친, 회복친의 3계통법을 환경감응형 옹성 불임 계통을 이용하여 2계통법으로 전환하고 있으나, 현재는 여러 가지 문제로 인하여 오히려 3계통법을 돌아가고 있는 실정이다. 본 연구에서 임성조절 가능한 형질전환체를 활용하면 보다 안정적인 2계통법 확립이 가능하며, 수량이 획기적으로 증수되는 초다수성 계통을 선발에 기여할 것으로 기대된다.

제4절 S-RNase 유전자의 RNA interference 방법에 의한 자가 화합성 사과 계통 육성

1. 연구개발결과의 활용계획

우리나라 사과의 주품종인 'Fuji' 에 S-alleles의 RNAi법을 이용하여 자가결실성인 'Fuji' 사과의 형질전환체는 타과수류에서 이용되는 것과 마찬가지로 자가결실성 품종육성에 교배친으로 이용될 수 있다. 사과에 있어서 자가결실성 품종의 개발은 인공수분에 따르는 노동력, 경비절감과 더불어 개화기의 기상이변 및 환경오염 등의 불안정한 환경에서도 안정적인 생산을 가능하게 할 수 있다. 또한 이는 앞으로의 사과육종의 소재로 이용될 수 있다. 유전자 발현 억제에 여러 방법 중 본 실험에 이용된 RNAi 기법은 '유전자 knock out 방법' 보다 더 효과적이라 알려져 있다. 과수류에서 국내 처음으로 시도된 RNAi 기술개발은 타과수류 포도, 복숭아 등에서도 gene function을 밝혀내거나, virus 내병성 van중 육종 등 여러 목적에 적용될 수 있다. 또한 형질전환후 mRNA 전사시 목적유전자가 hairpin RNAi 구조를 형성하기 위하여 각 S-RNase 유전자 단편을 sence 방향과 antisence 방향으로 삽입되게 하고 이들의 중간부분에 예기장대의 intron이 위치하도록한 pK7GWIWg2(II) vector의 이용은 RNAi를 이용한 고효율 gene silencing에 유용하게 적용될 수 있다. 사과 형질전환시 가장 문제가 되는 낮은 형질전환율 향상에 필요한 요인을 분석한 실험은 앞으로 사과 형질전환에 필요한 주요한 기술로 이용될 수 있다. 공동배양 기간동안의 ethylene 억제제의 효과적인 처리를 통하여 *Agrobacterium*의 infection율과 신초 재분화를 높일 수 있어 사과뿐만 아니라 타과수류의 형질전환실험에도 적용할수 있다. 또한 공동배양후 *Agrobacterium* 제거에 필요한 항생제의 농도와 종류 및 post selection을 이용한 형질전환율 향상은 형질전환을 통한 분자육종기술로 이용될 수 있다. 따라서 본 연구를 통하여 개발된 RNAi를 이용한 자가화합성 사과의 기술개발은 첫째, RNAi를 통한 자가화합성 'Fuji'형질 전환체는 자가결실성 품종육성에 교배친 혹은 품종으로 이용될 수 있고, 형질전환체는 특허출원을 통한 지식재산권의 확보가 가능할 것이고, 둘째, 형질전환율 향상을 위한 사과의 형질전환기술은 타과수류 등에 적용이 가능하고, 특히 ethylene억제제를 이용한 형질전환율 향상기술은 특허출원이 가능하다. 셋째, hpRNAi를 이용한 gene silencing 기술은 앞으로 유전자 발현억제 실험 등을 위한 기초자료로 유용하게 활용되어질 수 있을 것이다.

그러나 본 연구기간중 수행할 수 없었던 개화이후의 자가화합성 검토 및 자가화합육종을 위한 교배 부분으로써의 가치 등은 금후 이에 대한 보완 연구를 수행하여 자가화합사과 재배시 산업에 미치는 영향 등을 구명할 필요가 있다.

제5절 분자마커를 이용한 무·배추 무사마귀병 저항성 선발마커 개발

본 연구에서 개발된 무와 배추의 뿌리혹병 저항성 연관 표지는 품종육성을 위한 선발표지로 사용하여 내병성 F₁ 품종을 육성하는데 활용하고자 함.

제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외 과학기술정보

제1절 배추 복합내병성 CMS 계통 조기 육성과 그 체계 확립 및 분자표지 인자 개발

1. 분자마커를 이용하면 여교잡 세대를 단축시킬 수 있을 것이라는 생각으로 실험에 착수하였는데 이미 외국에서도 연구되고 있었으며 우리 보다 먼저 산업화하였다는 사실을 알게 되었다. 뿐만 아니라 검정비용이 상상도 안 되게 저렴하다는 사실도 알게 되었다.

2. 개발된 바이러스병 내병성 마커를 이용하여 검정한 결과 중국에는 이미 주요한 품종이 내병성 품종임을 알게 되었다.

제2절 Fox-hunting system을 이용한 배추속 작물의 저발현 기능유전자 대량획득 및 육종소재 창성

최근 GenBank에 배추 종의 DNA염기서열의 축적은 폭발적으로 증가하고 있다. Genoplante Consortium에서 31,011 개의 배추 EST를 제공했고, TIGR에서 300,000개의 양배추 유전체 shotgun sequence를 제공했다. 이러한 염기서열 정보가 증가됨에 따라 보다 효율적인 관리를 위해 database의 개발을 필요했고 현재 각 국에서 운영되고 있는 database의 종류는 아래와 같다.

영국은 *Brassica* 'A' 와 'C' 유전체의 기본적인 물리지도를 만들기 위해 BAC 라이브러리의 DNA fingerprinting(지문화)분석을 하였다. 또한 유전자 probe을 선별하여 애기장대 유전체 염기서열과 앞서 언급한 물리지도를 통합하고자 하였다. *Brassica* 와 애기장대에 관심 있는 사용자들에게 현재까지 출간된 자료, 애기장대 유전체 염기서열과 A, C 유전체간에 연결을 위해 사용된 probe와 BAC클론 등의 정보를 제공하기 위해 BBSRC *Brassica* IGF Project (<http://brassica.bbsrc.ac.uk/IGF/>)를 운영하고 있다. 유럽공동체와 중국은 공동으로 IMSORB: oilseed rape programme(<http://brassica.bbsrc.ac.uk/IMSORB/>)를 운영하면서 다양한 환경 조건에서 경쟁력 있는 oilseed rape 자원 품종을 개발하고 지속적인 신품종개발을 위한 지식을 축적하고 있다. 미국은 애기장대 유전체의 annotation율을 높이고, *Brassica*와 애기장대간에 염기서열 보존(conservation) 정도를 탐색하기 위해 *Brassica oleracea* GSS database (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/bog1/>, TIGR) 을 운영하고 있다. Cold Spring Harbor 그룹에서는 *Brassica* 유전체의 0.5 - 1배를 목표로 하여 전체 유전체 shotgun sequencing을 하고 있고, 이렇게 확보된 염기서열을 이미 분석이 완료된 애기장대와 비교, 재배열(alignment) 함위치(anchoring)시킴으로써 아직 기능을 알 수 없는 것으로 분류되었던 (novel)유전자를 새로 annotation 해석 할 수 있을 뿐만 아니라 유전자간의 공통된 혹은 차별화된 부위를 찾아낼 수 있으리라 기대한다. 캐나다는 *Brassica*와 애기장대 유전체간의 비교를 할 수 있는 browser, AAFC Comparative Genome Viewer (<http://brassica.agr>

gc.ca/navigation/viewere.shtml, SRC)를 운영하고 있다. TIGR에서 annotation기능분석(annotation)한 애기장대 유전체와 관련된 *Brassica napus* EST(60,000 cDNA의 3'과 5' sequences)를 보여주고 있다. 애기장대 유전체 정보는 'The Institute for Genomic Research'의 website에서 볼 수 있다(<http://www.tigr.org>). 한국은 www.brassica-rapa.org (농업생명공학연구원)를 운영하면서 통합지도 작성, 1번과 2번 염색체 염기서열 분석, BAC-ends 염기서열 분석, EST와 DNA Chip, 세포유전학, T-DNA와 Transposon Tagging Mutation 연구과제에 대한 결과를 관리하고 있다. JIC(영국)에서는 BAC 라이브러리 screening과 배급을 위해(<http://jicgenomelab.co.uk/libraries.html>)을 운영하고 있다. 호주에서는 *Brassica* ASTRA database(Love 등, 2004, 2005), SSR 및 SNP 개발, 유전체 지형도, 유전자 ontology 연구를 위해 PBC Bioinformatics (<http://hornbill.cspp.latrobe.edu.au/>)를 운영하고 있다. *Brassica* 유전체에 관련된 모든 정보를 집적하여 공유하고자 모든 자료가 <http://www.brassica.info/>에 공개 및 연결 되어 있다.

제3절 애기장대 응성불임 변이체를 이용한 임성관련 유전자의 분리 및 이용

애기장대와 같은 식물 혹은 작물로부터 응성불임 돌연변이체를 대상으로 응성불임 현상의 특성을 규명하고, 임성관련 유전자들을 클로닝하는 연구가 활발하게 수행되고 있으며, 꾸준히 연구결과가 발표되고 있다. 그럼에도 불구하고 농업적으로 활용가치가 높은 어떤 특정한 환경에서 임성을 회복할 수 있는, 즉 불임유발/임성회복을 조절가능한 응성불임성에 관한 연구정보는 매우 제한된 실정이다. 최근의 확인된 일부 응성불임 유발 유전자들을 소개하면 다음과 같다.

1. 세포막에 결합된 glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT)는 식물세포에서 glycerol-lipid생합성의 초기단계에 관여한다. GPAT변이유전자는 용단조직의 분화에 심각한 영향을 주어 대부분의 소포자가 성숙되기 전에 발육을 멈추게 한다. 그러므로 GPAT단백질이 *Arabidopsis* 화분발달과 임성유지에 중요한 역할을 함이 돌연변이체의 연구를 통해 밝혀졌다 (Plant Cell, 2003, 15:1872-1887).

2. *aborted microspores (ams)* mutant: T-DNA에 의해 유발된 응성불임 변이체로서 소포자가 tetrad로부터 유리된 직후, 퇴화되어 불임이 유발된다. 또한 화사의 길이가 짧아지는 현상도 보인다. 이 응성불임성은 basic helix-loop-helix (bHLH)유전자에 일어난 변이로 인해 기인됨이 밝혀졌는데 전형적인 transcription factor의 일종이다 (Plant J, 2003, 33:413-423).

3. *male sterility1 (ms1)* mutant: tetrad에서 소포자가 유리된 직후 퇴화하고, 용단조직 또한 비정상적인 액포의 형성을 보인다. *ms1*유전자는 인간, 효모 및 고등식물의 transcription factor에서 발견되는 PHD-finger motif와 강력한 유사성을 보이는 유전자임이 밝혀졌다 (Plant J. 2001, 28:27-39)

4. 대표적인 주곡작물인 벼의 경우, T-DNA집단에서 선발된 *RICE IMMATURE POLLEN1* 유전자는 성숙화분발달기에 매우 강하게 발현되며, 5개의 WD40 반복염기서열을 함유하는 단백질그룹과 유사성을 보인다(Han et al, 2006). 이 변이체의 유전분석 결과, 웅성배우자적 변이체임이 판명되었으며, 성숙화분을 GUS분석결과 대략 50%의 화분만이 GUS유전자의 발현을 보였다. 따라서 이 유전자의 promoter는 상기 기술한 문제점의 해결위해 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다. 또한 Ds-삽입집단에서 선발된 웅성불임 *Oryza sativa no pollen(Osnop)* 변이체는 개화기에 화분이 없는 표현형을 보인다. *Osnop* 변이를 유발하는 *delegen14* 유전자는 화분발달과 발아동안 중요한 역할을 담당하는 유전자인 것으로 보이며, 이 유전자의 promoter 역시 활용 가능한 것으로 생각된다(Jiang et al, 2005)

5. 회복가능한 웅성불임성 유기를 위해 정확하게 화분에서만 작동하는 promoter의 확보가 매우 중요하다. 만약 promoter가 화분 뿐만 아니라, 약(anther)/용단조직(tapetum)에서도 발현하게 되면 T0세대 T-DNA가 이형접합체의 상태에서도 불임 등의 변이표현형의 확인이 가능하여, 이를 이용해 F1잡종증자를 생산하였을 경우, F1 식물 자체가 불임표현형을 나타내어 식물 전체의 biomass는 매우 증가하지만, 정작 곡물의 생산성이 급격히 감소할 수 있기 때문이다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 웅성배우자 특이적 발현 promoter(male-gametophytic specific promoter)를 사용해야 하는데, 최근 많은 작물을 대상으로 화기조직별 유전자발현정보가 발표되고 있으며, 이를 바탕으로 새로운 vector 제작을 시도하고 있다.

제4절 S-RNase 유전자의 RNA interference 방법에 의한 자가화합성 사과 계통 육성

외국의 경우 RNAi를 이용한 일시에 많은 식물체 유전자의 기능을 가장 효과적으로 분석하는데 이용되고 있다. 지금까지는 유전자의 기능을 밝히기 위하여 주로 돌연변이를 유발하거나 transposon, T-DNA insertion 등을 이용하여 왔으나 이들 방법의 가장 큰 단점은 삽입되는 부위가 무작위로 이루어지는 것이다. 하지만 여러 genome project등 통하여 많은 유전자가 대량으로 sequence 되고 있으나, 이들 유전자 기능을 알아내는 것이 무엇보다 중요한 일이다. RNAi를 이용한 gene silencing은 돌연변이 유발과 다르게 유전자의 상동성에 의하여 이루어지므로 삽입한 목적유전자의 형질을 밝히는데 매우 효과적으로 이용될 수 있다(Matthew, 2004). 또한 Small(2007)은 RNAi의 장점은 우성이므로 T1세대에 표현형을 확인할 수 있고, 이는 특이조직과 식물발현에 있어서 시간을 조절할 수 있고, 그 확인 방법이 매우 빠르다고 하고 있다. 이런 장점을 이용하여 Arabidopsis에서 대량유전자에 대한 유전자 기능분석을 하고 있다(Hillson et al., 2004). 하지만 이런 RNAi 방법이 동물의 실험에서는 예상하지 않은 유전자의 silencing을 일으킬 수 있다고 보고 하였다(Fedorov, et al., 2006; Ma et al., 2006).

제5절 분자마커를 이용한 무·배추 무사마귀병 저항성 선발마커 개발

1. 'CR Shinki'계통을 이용하여 육성한 분리집단 143 F3 family를 이용하여 저항성 유전자와 연관된 표지 개발 (충남대학교 임용표 교수)

2. 유전적으로 균일한 단포자 유래병원균을 이용하여 새로운 저항성 source로 알려진 CR 새로운 저항성 유전 양식 및 저항성 유전자와 연관된 DNA 표지인자 (강원도 고랭지 시험장 조광수)

3. 유럽순무 (European fodder turnip)에서의 저항성 유전양상은 하나 이상의 주동유전자와 여러 개의 미동유전자에 의해 저항성이 유전됨.

4. 유럽순무중에서 뿌리혹병 병원균의 병원성검정을 위한 differential host로 이용되는 'ECD4' 계통은 *P. brassicae* isolate에 대해 아주 높은 저항성을 보이는 것으로 보고되고 있음.

5. 뿌리혹병 저항성계통인 'Siloga'와 'Milan White'에서 유래한 계통을 이용한 분리집단에서 저항성 유전양상 분석 및 저항성 유전자 (*Crr1*, *Crr2*, *Crr3*) 연관 표지 (Hirai박사팀)

제 7 장 참고문헌

제1절 배추 복합내병성 CMS 계통 조기 육성과 그 체계 확립 및 분자표지 인자 개발

AVRDC, 1984. progress report 1982, Chinese cabbage pathology-turnip mosaic virus strain detection-. p 75-85, AVRDC. Taiwan, Roc.

Baillie, A. M. K., D. J. Epp, D. Hutcheson and W. A. Keller. 1992. *In vitro* culture of isolated microspores and regeneration of plants in *Brassica campestris*. Plant Cell Rep. 11; 234-237

Bannerot, H., L. Loulidard, M. Y. Cauderon and J. Tempe. 1974. Transfer of cytoplasmic male sterility from *Raphanus sativus* to *Brassica oleracea*. p. 52-54. Eucarpia Meeting *Cruciferae*. Dundee.

Bannerot, H., L. Loulidard, et Y. Chupeau. 1977. Unexpected difficulties met with radish cytoplasm in *Brassica oleracea*. Eucarpia *cruciferae* Newsl. 2:16

정동민, 문재철, 김동수. 1977. 품종간 교잡으로 유기된 무의 옹성불임성에 관한 연구, 제1보. 유전자 분석 및 종자 생산에 관하여. 한육지. 18(2):145-156.

정덕교. 1966. 이질세포질 배추에 관한 연구. 연속 퇴교잡에 의한 유채 세포질 배추의 육성. 한육지. 2: 119-125

한창열. 1992. 우 장춘 박사의 주요 연구 업적과 오늘의 유전학 및 육종기술. UR대응 작물 육종에 관한 심포지움 '92년도 4월의 문화인물 "우 장춘 박사" 기념 논문집. p.1-20

Health, D. W., Elizabeth D. Earle and M. H. Dickson. 1994. Introgressing cold-tolerant *Ogura* cytoplasm from rapeseed into pakchoi and Chinese cabbage. Hortscience. 29(3):202-203

Hirata, Y, T. Motegi, Y. Takeda and K. Morikawa. 2001. Induction of cytoplasmic male sterility in the seed progeny derived from artificially-synthesized interspecific chimera in *Brassica*. Euphytica 117:143-149

Kaul, M. L. H. 1988. Male sterility in higher plant. Springer-Verlag, Berlin. pp. 15-192

김기인, 서호범, 이수성, 윤무경. 1999. 배추의 품종 또는 아종간 이면교잡에 있어서 동위효소의 전기영동법을 이용한 잡종강세 추정. 한원지.40: 678-682

- 이수성. 1985. 채소작물 품종개량의 현황과 문제점. 한육지. 17(3): 253-262
- 이수성. 1992. 우리 나라 원예육종기술의 현재와 미래. UR대응 작물 육종에 관한 심포지움 '92년도 4월의 문화인물 "우 장춘 박사"기념 논문집. p.58-68
- 이수성, 김종기, 전 원, 최우진. 2001. 배추 무름병 저항성 순계 육성. 한원지. 42: 682-684
- 이수성, 서호범, 최우진(1999). 배추 순무 모자의 바이러스 및 무사마귀병 복합저항성 집단의 순환선발에 의한 개량. 원예학회 발표요지. 원과지 17(5): 653
- Mariani, Celesrina, Maec De Beuckelleer, Jessie Truettner, Jan Leemans and Robert B. Goldberg. 1990. Induction of male sterility in plants by a chimeric ribonuclease gene. Nature. 347: 737-741
- Mariani, C., V. Gossele, M. De Beuckeleer, M. De Block, R. B. Goldberg, W. De Greef and J. Leemans, 1992. A chimeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. Nature 357: 384-387
- Motegi, T., I. S. No, J. Zhou, A. Kanno, T. Kameya and Y. Hirata. 2003. Obtaining an Ogura-type CMS line from asymmetrical protoplast fusion between cabbage(fertile) and radish(fertile). Euphytica 129:319-323
- Ogura, H. 1968. Studies on the new male sterility in Japanese radish with special reference to utilization of this sterility toward the practical raising of hybrid seeds. Mem. Fac. Agri. Kagoshima Univ. 6-39-78
- Ohta, Y., Y. Hirata, T. Motegi, G. Hattori and T. Noguchi. 2006. Analysis of chloroplast genome of two cytoplasmic male sterile lined derived from interspecific chimera and intergeneric somatic hybrid in Brassicaceae. Breeding Science 56:1-5
- 박효근. 1992. 작물육종에 있어서 생명공학 기법의 활용현황과 문제점. UR대응 작물 육종에 관한 심포지움 '92년도 4월의 문화인물 "우 장춘 박사" 기념 논문집. p .69-92
- Ren, J., M. H. Dickson. 1997. Release of four soft rot resistant Chinese cabbage lines C-26, 27, 28, and 29. *Cruciferae* Newsl. 17: 84-85
- Sato, T., T. Nishio and M. Hirai. 1989. Plant regeneration from isolated microspore culture of Chinese cabbage(*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*). Plant Cell Rep. 8; 486-488

Strandberg, J. O. and P. H. Williams. 1967. Inheritance of clubroot resistance in Chinese cabbage. *Phytopathology* 57: 330

Suh, S. K., S. K. Green and H. G. Park. 1995. Genetics of resistance to five strains of turnip mosaic virus in Chinese cabbage. *Euphytica* 81: 71-77

Williams, P. H. and F. W. Heyn. 1981. The origin and development of cytoplasmic male sterile Chinese cabbage. Chinese cabbage 293-300. Proc. 1st. Int'l. Sympo. eds. N. S. Talekar and T. D. Griggs. AVRDC.

Yamagishi, H. and T. Trachi. 2001. Intra- and inter-specific variations in the mitochondrial gene *orf138* of Ogura-type male sterile cytoplasm from *Raphanus raphanistrum*. *Theor. Appl. Genet.* 103:75-732

Yoon, J. Y., S. K. Green and R. T. Opena. 1993. Inheritance of resistance to turnip mosaic virus in Chinese cabbage. *Euphytica* 69: 103-108

윤진영, 이수성, 윤충효, 오대근. 1981. 세포질 옹성불임성을 이용한 배추 1대잡종 육종연구. <제1보> 세포질 옹성불임성 배추의 기원과 특성. *한육지*. 13(2): 134-138

Yoshikawa, H. 1981. Breeding for clubroot resistance in Chinese cabbage. Chinese cabbage, 405-413. Proc. 1st. Int'l. Symp. eds. N. S. Talekar and T. D. Griggs. AVRDC, Taiwan, ROC.

제2절 Fox-hunting system을 이용한 배추속 작물의 저발현 기능유전자 대량획득 및 육종소재 창성

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF *et al.* (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-2195.

Adams MD, Dubnick M, Keriavage AR, Moreno R, Kelly JM, Utterback TR, Nagle JW, Fields C, and Venter JC (1992) Sequence Identification of 2,375 Human Brain Genes. *Nature* 355:632-634.

Adams MD, Kelly JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xlao H, Merrill CR, Wu A, Olde B, Moreno RF, Kerlavage AR, McCombie WR, and Venter JC (1991) Complementary DNA Sequencing : Expressed Sequence Tags and Human Genome Project. *Science* 252:1651-1656.

Alwine JC, Kemp DJ, and Stark GR (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization of DNA probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5350–5354.

An S, Park S, Jeong DH, Lee DY, Kang HG, Yu JH, Hur J, Kim SR, Kim YH, Lee M, Han S, Kim SJ, Yang J, Kim E, Wi SJ, Chung HS, Hong JP, Choe V, Lee HK, Choi JH, Nam J, Kim SR, Park PB, Park KY, Kim WT, Choe S, Lee CB, An G (2003) Generation and analysis of end sequence database for T-DNA tagging lines in rice. Plant Physiol. 133:2040–2047.

Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature 408:796–815.

Asamizu E, Nakamura Y, Sato S, Tabata S (2000) A large-scale analysis of cDNA in *Arabidopsis thaliana*: generation of 12,028 non-redundant expressed sequence tags from normalized and size-selected cDNA libraries. DNA Research 7:175–180.

Bechtold N and Pelletier G (1998) In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. Methods Mol. Biol. 82:259–266.

Boguski MS and Schuler GD (1995) EST ablising a human transcript map. Nat. Genet. 10:369–371.

Bevan M (1984) Binary *Agrobacterium* Vectors for Plant Transformation. Nucleic Acids Research 12:8711–8721.

Carninci P, Arthur W, Yoko N, Tomoya O, Masayokhi I, Sumiharu N, Nobuya S, Yasushi O, Masami M, Claudio S, Yoshihide H (1997) High efficiency selection of full-length cDNA by improved biotinylated cap trapper. DNA Research 4:61–66.

Carninci P, Kvam K, Kitamura, Akiko K, Tomoya O, Yasushi O, Mamoru K, Kazuhiro S, Nobuy S, Masaki I, Yoshihide H, Claudio S (1996) High efficiency full-length cDNA cloning by biotinylated cap trapper. Genomics 137:327–336.

Carninci P, Yuko S, Norihito H, Masayoshi I, Toshiyuki S, Tomoko H, Akira W, Kazuhiro S, Hideaki K, Masami M, Yoshihide H (2001) Balanced-size and ling-size cloning of full-length cap-trapped cDNAs into vectors of the novel λ -FLC family allows enhanced gene discovery rate and functional analysis. Genomics 77(1):79–90.

Carninci P, Yuko S, Norihito H, Yuichi S, Kazuhiro S, Masayoshi I, Hideaki K, Yasushi O, Masami M, and Yoshihide H (2006) Normalization and subtraction of cap-trapper-

selected cDNAs to prepare full-length cDNA libraries for rapid discovery of new genes. *Genome Research* 10:1617–1630.

Chen S, Jin W, Wang M., Zhang F, Zhou J, Jia Q, Wu Y, Liu F, Wu P (2003) Distribution and characterization of over 1,000 T-DNA tags in rice genome. *Plant J.* 36:105–113.

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159.

Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16:735–743.

Cooke R, Raynal M, Laudié M, Grellet F, Delseny M, Morris PC, Guerrier D, Giraudat J, Quigley F, Clabault G, Li YF, Mache R, Krivitzky M, Gy IJ, Kreis M, Lecharny A, Parmentier Y, Marbach J, Fleck J, Clément B, Philipps G, Hervé C, Bardet C, Tremousaygue D, Höfte H, *et al.* (1996) Further progress towards a catalogue of all *Arabidopsis* genes: analysis of a set of 5,000 non-redundant ESTs. *Plant J.* 9:101–124.

Chung MH, Chen MK, and Pan SM (2000) Floral spray transformation can efficiently generate *Arabidopsis* transgenic plants. *Transgenic Res.* 9: 471–476.

Clough SJ and Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16:735–743.

Cocking EC and Davey MR (1987) Gene Transfer in Cereals. *Science* 236:1259–1262.
Dalmay T, Hamilton A, Mueller E, and Baulcombe DC (2000) Potato virus X amplicons in *Arabidopsis* mediate genetic and epigenetic gene silencing. *Plant Cell* 12: 369–379.

Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, and Trent JM (1999) Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat. Genet.* 21: 10–14.

Eisen MB and Brown PO (1999) DNA arrays for analysis of gene expression. *Methods Enzymol.* 303:179–205.

Fujita M, Saho M, Yasunari F, Takanari I, Miki N, Motoaki S, Minami M, Kazuko Y-S, Kazuo S (2007) Identification of stress-tolerance-related transcription-factor genes via mini-scale full-length cDNA over-expressor (FOX) gene hunting system. *B.B. R.C.* 364:250–257.

Goldberg RB (1988) Plants : Noverl Developmental Processes. *Science* 240:1460–1467.

Goodman RM, Hauptli H, Crossway A, Kanuf VC (1987) Gene Transfer in Crop Improvement Science 236:8711–8721.

Hajdukiewicz P, Svab Z, and Maliga P (1994) The small, versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. Plant Mol. Biol. 25:989–994.

Hayashi H, Czaja I, Lubenow H, Schell J, and Walden R (1992) Activation of a plant gene by T-DNA tagging: auxin-independent growth in vitro. Science 258:1350–1353.

Hirochika H, Guiderdoni E, An G, Hsing YI, Eun MY, Han C, Upadhyaya N, Ramachandran S, Zhang Q, Pereira A, Sundaresan V, Leung H (2004) Rice mutant resources for gene discovery. Plant Mol. Biol. 54:325–334.

Höfte H, Desprez T, Amselem J, Chiapello H, Caboche M, Moisan A, Jourjon M-F, Charpentreau J-L, Berthomieu P, Guerrier D, Giraudat J, Quigley F, Thomas F, Yu D-Y, Mache R, Raynal M, Cooke R, Grellet F, Delseny M, Parmentier Y, Marcillac GD, Gigot C, Fleck J, Philipps G, Axelos M, Bardet C, Tremousaygue D, Lescure B (1993) An inventory of 1,152 expressed sequence tags obtained by partial sequencing of cDNAs from *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 4:1051–1061.

Ichikawa T, Nakazawa M, Kawashima M, Muto S, Gohda K, Suzuki K, Ishikawa A, Kobayashi H, Yoshizumi T, Tsumoto Y, Tsuchihara Y, Iizumi H, Goto Y, Matsui M (2003) Sequence database of 1,172 T-DNA insertion sites in *Arabidopsis* activation tagging lines that showed phenotypes in T1 generation. Plant J. 36:421–429.

Ichikawa T, Nakazawa M, Kawashima M, Iizumi H, Kuroda H, Kondou Y, Tsuchihara Y, Suzuki K, Ishikawa A, Seki M, Fujita M, Motohashi R, Nagata N, Takagi T, Shinozaki K, Matsui M (2006) The FOX hunting system: an alternative gain-of-function gene hunting technique. Plant J. 48:974–985.

Jeong DH, An SY, Kang HG, Moon S, Han JJ, Park S, Lee HS, An K, An GH (2002) T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice. Plant Physiol. 130:1636–1644.

Jeong DH, An SY, Park SH, Kang HG, Park GG, Kim SR, Sim J, Kim YO, Kim MK, Kim SR, Kim JW, Shin MS, Jung MY, An GH (2006) Generation of a flanking sequence-tag database for activation-tagging lines in *japonica* rice. Plant J. 45:123–132.

Gunther EJ, Murray NE, Glazer P (1993) High efficiency, restriction-deficient *in vitro* packaging extracts for bacteriophage lambda DNA using a new *E. coli* lysogen. Nucleic Acids Res. 21: 3903–3904.

- Kakimoto T. (1996) CKI1, a Histidine Kinase Homolog Implicated in Cytokinin Signal Transduction. *Science* 274: 982–985.
- Kempin SA, Liljegren SJ, Block LM, Rounsley SD, Yanofsky MF, and Lam E (1997) Targeted disruption in *Arabidopsis*. *Nature* 389: 802–803.
- Kolesnik T, Szeverenyi I, Bachmann D, Kumar CS, Jiang S, Ramamoorthy R, Cai M, Ma ZG, Sundaresan V, Ramachandran S (2004) Establishing an efficient *Ac/Ds* tagging system in rice: large-scale analysis of *Ds* flanking sequences. *Plant J.* 37: 301–314.
- Kuhlemeier C, Green PJ, and Chua N–H (1987) Regulation of Gene Expression in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology.* 38:221–257.
- Lemieux B, Aharoni A, and Schena M (1998) Overview of DNA chip technology. *Mol. Breed.* 4:277–289.
- Lennon GG and Lehrach H (1991) Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries. *Trends Genet* 7:314–317.
- Liang P and Pardee AB (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967–971.
- Marsch-Martinez N, Greco R, Van Arkel, G, Herrera-Estrella L, Pereira A (2002) Activation tagging using the En-I maize transposon system in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129:1544–1556.
- Meyerowitz EM and Pruitt RE (1985) *Arabidopsis thaliana* and Plant Molecular Genetics. *Science* 229:1214–1218.
- Miyao A, Tanaka K, Murata K, Sawaki H, Takeda S, Abe K, Shinozuka, Onosato K, Hirochika H (2003) Target site specificity of the *Tos17* retrotransposon shows a preference for insertion within genes and against insertion in retrotransposon-rich regions of the genome. *Plant Cell* 15:1771–1780.
- Miyao A, Iwasaki Y, Kitano H, Itoh J, Maekawa M, Murata K, Yatou O, Nagato Y, Hirochika H (2007) A large-scale collection of phenotypic data describing an insertional mutant population to facilitate functional analysis of rice genes. *Plant Mol. Biol.* 63:625–635.
- Nakamura H, Makoto H, Kou A, Akio M, Naoko T, Mariko K, Jinhuan P, Naokuni H, Shigeiko A, Seiichi T, Miki F, Akiko E, Motoaki S, Miki N, Takanari I, Kazuo S, Minami M, Yoshiaki N, Hirohiko I (2007) A genome-wide gain-of-function analysis of rice genes using the FOX-hunting system. *Plant Mol. Biol.* 65:357–371.

Nakazawa, M. and Matsui, M. (2003) Selection of hygromycin resistant *Arabidopsis* seedlings. *Biotechniques*, 34:28–30.

Nakazawa M, Yabe N, Ichikawa T, Yamamoto YY, Yoshizumi T, Hasunuma K, Matsui M (2001) *DFL1*, an auxin-responsive *GH3* gene homologue, negatively regulates shoot cell elongation and lateral root formation, and positively regulates the light response of hypocotyl length. *Plant J.* 25: 213–221.

Nakazawa M, Ichikawa T, Ishikawa A, Kobayashi H, Tsuhara Y, Kawashima M, Suzuki K, Muto S, Matsui M (2003) Activation tagging, a novel tool to dissect the functions of a gene family. *Plant J.* 34:741–750.

Newman T, De Bruijn FJ, Green P, Keegstra K, Kende H, McIntosh L, Ohlrogge J, Raikhel N, Somerville S, Thomashow M, *et al.* 1994. Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones. *Plant Physiol.* 106:1241–1255.

Odell JT, Nagy F, and Chua NH (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313:810–812.

Okamoto JK and Goldberg RB. (1989) Regulation of Plant Gene Expression : General Principles. *The Biochemistry of Plants* 15:1–82.

Olson M, Hood L, Cantor C, and Bostein D. (1989) A Common Language for Physical Mapping the Human Genome : Current Status. *Science* 250:237–51.

Palazzolo MJ, Palazzolo MJ, Hamilton BA, Ding DL, Martin CH, Mead DA, Mierendorf RC, Raghavan KV, Meyerowitz EM, Lipshitz HD (1990) Phage lambda cDNA cloning vectors for subtractive hybridization, fusion-protein synthesis and *Cre loxP* automatic plasmid subcloning. *Gene.* 88: 25–36.

Park SH, Jun NS, Kim CM, Oh TY, Huang J, Xuan YH, Park SJ, Je BI, Piao HL, Park SH, Cha YS, Ahn BO, Ji HS, Lee MC, Suh SC, Nam MH, Eun MY, Yi G, Yun DW, Han CD (2007) Analysis of gene-trap *Ds* rice populations in Korea. *Plant Mol. Biol.* 65(4):373–384.

Ryu CH, You JH, Kang HG, Hur J, Kim YH, Han MJ, An K, Chung BC, Lee CH, An G (2004) Generation of T-DNA tagging lines using a bi-directional gene trap vector and the establishment of an insertion-site database. *Plant Mol. Biol.* 54:489–502.

Sal G, Manfioletti G, Schneider C (1989) The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *BioTechniques* 7: 514–519.

Sallaud C, Gay C, Larmande P, Bès M, Piffanelli P, Piégu B, Droc G, Regad F, Bourgeois

E, Meynard D, Périn C, Sabau X, Ghesquière A, Glaszmann JC, Delseny M, Guiderdoni E (2004) High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards *in silico* reverse genetics. *Plant J.* 39:450–464.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Schena M, Shalon D, Davis RW and Brown PO (1995) Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science* 270: 467–470.

Seki M, Masakazu S, Tetsuya S, Kenji A, Kei I, Junko I, Maiko N, Akiko E, Mari N, Miki F, Youko O, Ayako K, Kazuko Y-S, Kazuo S (2004) RIKEN arabidopsis full-length (RAFL) cDNA and its applications for expression profiling under abiotic stress conditions. *Journal of Experimental Botany* 55(395):213–223.

Shah DM, Horsch RB, Klee HJ, Kishore GM, Winter JA, Tumer NE, Hironaka CM, Sanders CS, Aykent S, Siegel NR, Rogers SG, Fraley RT (1986) Engineering Herbicide Tolerance in Transgenic Plants. *Science* 233:478–481.

Shibata K, Masayoshi I, Katsunori A, Sumiharu N, Nobuya S, Piero C, Hideaki K, Junichi A, Katsuo N, Tokuji K, Hideo T, Mari I, Noriko S, Yoshiyuki I, Shin N, Makoto H, Tsutomu N, Akira H, Rintaro Y, Hiroyuki M, Sumito S, Takashi I, Katsuya K, Syuji F, Kouji I, Yoshiyuki T, Masaki I, Eiji O, Masanori W, Yuko Y, Tomokazu I, Kaori O, Takumi T, Shuji M, Jun K, Yasushi O, Masami M, Yorinao I, Akira K, Yoshihide H (2000) RIKEN integrated sequence analysis (RISA) system-384-format sequencing pipeline with 384 multicapillary sequencer. *Genome Res.* 10: 1757–1771.

Stephens JC, Cavanaugh ML, Gradie MI, Mador ML, Kidd KK (1990) Mapping the Human Genome : Current Status. *Science* 250:237–244.

Song KM, Osborn TC, and Williams PH. (1988) Brassica Taxonomy Based on Nuclear Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs). 1. Genome Evolution of Diploid and Amphidiploid Species. *Theoretical and Applied Genetics* 75:784–794.

Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 29:417–426.

Uchimiya H, kidou S, Shimazaki T, Aotsuka S, Takamatsu S, Nishi R, Hanshimoto H, Matsubayashi Y, Kidou N, Umeda M, and Kato A (1992) Random Sequencing of cDNA Libraries Reveals a Variety of Expressed Genes in Cultured Cells of Rice (*Oryza sativa* L.).

The Plant journal 2:1005–1009.

Upadhyaya NM, Zhou X-R, Ramm K, Zhu Q-H, Wu L, Eamens AL, Sivakumar R, Kato T, Yun D-W, Kumar S, Narayanan KK, Peacock WJ, Dennis ES (2002) An *iAc/Ds* gene and enhancer trapping system for insertional mutagenesis in rice. *Funct Plant Biol.* 29:547–559.

Vaeck M, Reynaerts A, Hofte H, Jansens S, Beuckeleer M, Dean C, Zabeau M, Van Montagu M, and Leemans J (1987) Transgenic Plants Protected from Insect Attack. *Nature* 328:33–37.

van Enckevort LJ, Droc G, Piffanelli P, Greco R, Gagneur C, Weber C, González VM, Cabot P, Fornara F, Berri S, Miro B, Lan P, Rafel M, Capell T, Puigdomènech P, Ouwerkerk PB, Meijer AH, Pe' E, Colombo L, Christou P, Guiderdoni E, Pereira A (2005) EU-OSTID: a collection of transposon insertional mutants for functional genomics in rice. *Plant Mol. Biol.* 59:99–110.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B and Kinzler KW (1995) Serial Analysis of Gene Expression. *Science* 270: 484–487.

Walden R, Fritze K, Hayashi H, Miklashevichs E, Harling H, Schell J (1994) Activation tagging: a means of isolating genes implicated as playing a role in plant growth and development. *Plant Mol. Biol.* 26:1521–1528.

Watson A, Mazumder A and Stewart M (1998) Technology for microarray analysis of gene expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:609–614.

Weigel D, Ahn JH, Blazquez MA, Borevitz JO, Christensen SK, Fankhauser C, Ferrandiz C, Kardailsky I, Malancharuvil EJ, Neff MM *et al.* (2000) Activation Tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 122: 1003–1013.

White JA, Todd J, Newman T, Focks N, Girke T, Ilárduya OMD, Jaworski JG, Ohlrogge JB, Benning C (2000) A new set of *Arabidopsis* expressed sequence tags from developing seeds the metabolic pathway from carbohydrates to seed oil. *Plant Physiol.* 124: 1582–1594.

Wilson K, Long D, Swinburne J, and Coupland G (1996) A Dissociation insertion causes a semidominant mutation that increases expression of TINY, an *Arabidopsis* gene related to APETALA2. *Plant Cell* 8: 659–671.

Yokotani N, Tkaanari I, Youichi K, Minami M, Hirohiko H, Masaki I, Kenji O (2008) Expression of rice heat stress transcription factor *OsHsfA2e* enhances tolerance to environmental stresses in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* 227:957–967.

제3절 애기장대 융성불임 변이체를 이용한 임성관련 유전자의 분리 및 이용

Chen YCS, McCormick S (1996) *Mcsidecar pollen*, an *Arabidopsis thaliana* male gametophytic mutant with aberrant cell divisions during pollen development. *Development* 122: 3243–3253.

Han MJ, Jung KH, Yi G, Lee DY, An G (2006) *Rice Immature Pollen 1 (RIP1)* is a regulator of late pollen development. *Plant Cell Physiology* 47: 1457–1472

Jiang SY, Cai M, Ramachandran S (2005) The *Oryza sativa* no pollen (Osnop) gene plays a role in male gametophyte development and most likely encodes a C2-GRAM domain-containing protein. *Plant Molecular Biology* 57: 835–853

Kaltschmidt JA, Dacidson CM, Brown NH, Brand AH (2000) Rotation and asymmetry of the mitotic spindle direct asymmetric cell division in the developing central nervous system. *Nature cell biology* 2: 7–12.

Mariani C, De Beuckeleer M, Truettner J, Leemans J, Goldberg RB (1990) Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* 347: 737–741

Mariani C, Gossele V, De Beuckeleer M, De Block M, Goldberg RB, De Greef W, Leemans J (1992) A chimaeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature* 357: 384–387

Nonomura KI, Miyoshi K, Eiguchi M, Suzuki T, Miyao A, Hirochika H, Kurata N (2003) The *MSPI* Gene Is Necessary to Restrict the Number of Cells Entering into Male and Female Sporogenesis and to Initiate Anther Wall Formation in Rice. *Plant Cell* 15: 1728–1727

Oh SA, Johnson A, Smertenko A, Rahman D, Park SK, Hussey PJ, Twell D (2005) A divergent cellular role for the FUSED kinase family in the plant-specific cytokinetic phragmoplast. *Current Biology* 15:2107–2111

Park SK, Howden R, Twell D (1998) The *Arabidopsis thaliana* gametophytic mutation *geminipollen1* disrupts microspore polarity, division asymmetry and pollen cell fate. *Development* 125: 3789–3799

Park SK, Rahman D, Oh SA, Twell D (2004) *geminipollen2*, a male and female gametophytic cytokinesis defective mutation. *Sexual Plant Reproduction* 17: 63–70

Park SK, Twell D (2001) Novel patterns of ectopic cell plate growth and lipid body distribution in the *Arabidopsis gemini pollen1* mutant. *Plant Physiology* 126: 899–909

Sorensen A–M, Kröber S, Unte US, Huijser P, Dekker K, Saedler H (2003) The *Arabidopsis ABORTED MICROSPORES (AMS)* gene encodes a MYC class transcription factor 33: 413–423

Twell D, Oh SA, Honeys D (2006) Pollen development, a genetic and transcriptomic view *Plant Cell Monogr* 3: 15–45.

Twell D, Park SK, Hawkins TJ, Schubert D, Schmidt R, Smertenko A, Hussey PJ (2002) MOR1/GEM1 has an essential role in the plant–specific cytokinetic phragmoplast. *Nature Cell Biology* 4: 711–714

Twell D, Park SK, Lalanne E (1998) Asymmetric division and cell–fate determination in developing pollen. *Trends in Plant Science* 3: 305–310

Wilson ZA, Morroll SM, Dawson J, Swarup R, Tighe PJ (2001) The *Arabidopsis MALE STERILITY1 (MS1)* gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD–finger family of transcription factors. *Plant J* 28: 27–39

Zheng Z, Xia Q, Dauk M, Shen W, Selvaraj G, Zou J (2003) *Arabidopsis AtGPAT1*, a Member of the Membrane–Bound Glycerol–3–Phosphate Acyltransferase Gene Family, Is Essential for Tapetum Differentiation and Male Fertility. *Plant Cell* 15: 1872–1887

제4절 S–RNase 유전자의 RNA interference 방법에 의한 자가화합성 사과 계통 육성

Alsheikh, M.K., H.P. Suso, M. Robson, N.H. Battey and A. Wetten, 2002. Appropriate choice of antibiotic and *Agrobacterium* strain improves transformation of antibiotic–sensitive *Fragaria vesca* and *F. v. semperflorens*. *Plant Cell Rep.* 20:1173–1180.

Alsheikh, M.K., H.P. Suso, M. Robson, N.H. Battey, A. Wetten, 2002. Appropriate choice of antibiotic and *Agrobacterium* strain improves transformation of antibiotic–sensitive *Fragaria vesca* and *F.V. semperflorens*. *Plant Cell Rep.* 20:1173–1180

Alston, F. H. 1996. Incompatibility alleles and apple pollinaiton. *Acta Hort.* 423:119–124

Amarzguioui M., T. Holen, E. Babaie, and H. Prydz, 2003. Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res.* 31:589-595.

Anderson, M.A., E.C. Cornish, S.L. Mau, E.G. Willians, R. Hoggart, A. Atkinson, I. Bonig, B. Grego, R. Simpson, P.J. Haley, J.D. Penschow, H.D. Niall, G.W. Tregear, J.P. Coghlan, R.J. Crawford & A.E. Clarke, 1986. Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature*. 321:38-44.

Bell, R. L., R. Scorza, C. Srinivasan and K. Webb. 1999. Transformation of 'Beurre Bosc' pear with the rolC gene. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124: 570-574

Bolar, J.P., S.K. Brown, J.L. Norelli, H.S. Aldwinckle, 1998. Factors affecting the transformation of 'Marshall McIntosh' apple by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 55:31-38.

Boskovic, R., K.R. Tobutt, 1999. Correlation of stylar ribonuclease isoenzymes with incompatibility alleles in apple. *Euphytica*. 107:29-43.

Broothaerts, W., G.A. Janssens, P. Proost & W.F. Broekaert, 1995. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Mol Biol.* 27:499-511.

Caplen N.J., S. Parrish, F. Imani, A. Fire, and R.A. Morgan, 2001. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc. Natl Acad. Sci USA.* 98:9742-9747.

Cervera, M., J.A. Pina, J. Juárez, L. Navarro, L. Peña 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Rep.* 18:271-278.

de Nettancourt, D., 1977. *Incompatibility in Angiosperms*. Springer-Verlag, Berlin.

Denli, A. M. and G. J. Hannon. 2003. RNAi: an ever-growing puzzle. *Trends in Biochemical Sciences.* 28(4):196-201

Elbashir S.M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl, 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 411: 494-498.

Elbashir S.M., W. Lendeckel, and T. Tuschl, 2001. RNA interference is mediated by 21 and 22 nt RNAs. *Genes Dev.* 15: 188-200.

Fedorov, Y., E. M. Anderson, A. Birmingham, A. Reynolds, J. Karpilow, K. Robinson, D.

Leake, W. S. Marshall and A. Khvorova. 2006. Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA*. 12:1188–1196

Fire A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and C.C. Mello, 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391:806–811.

Frankel, R. & E. Galun, 1977. *Pollination Mechanisms, Reproduction and Plant Breeding*. Springer-Verlag, Berlin, New York.

Goh, C.J., S.K. Ng, P. Lakshmanan, C.S. Loh, 1997. The role of ethylene on direct shoot bud regeneration from mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) leaves cultured in vitro. *Plant Sci*. 124: 193–202.

Goldway, M., D. Schneider, H. Yehuda, A. Matityahu, D. Eisikowitch and R.A. Stern. 2001. The effect of apple S-allele compatibility on fruit set levels in non-optimal fertilization conditions. 561: 231–234

Golz, J. F., A. E. Clarke and E. Newbigin. 1995. Self-incompatibility flowering plant. *Curr. Opin. Genet. Dev*. 5:640–645

Gutierrez-E, M. A., D. Luth and G. A. Moore. 1997. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in Citrus and production of sour orange plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Rpt*. 16: 745–753.

Hellens, R., P. Mullineaux, H. Klee, 2000. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci*. 5:446–451.

Hilston. P., J. Allemeersch, T. Altmann, S. Aubourg, A. Avon, J. Beynon, R. P. Bhalerao, F. Bitton, M. Caboche, B. Cannoot et al. 2004. Versatile gene-specific sequence tags for *Arabidopsis* functional genomics: transcript profiling and reverse genetics applications. *Genome Res*. 14:2176–2189

Holen, T., M. Amarzguioui, E. Babaie and H. Prydz. 2003. Similar behaviour of single-strand and double-strand siRNAs suggests they act through a common RNAi pathway. *Nucleic Acids Research*. 31(9):2401–2407.

Horsch, R.B., J.E. Fry, N.L. Hoffmann, D. Eichholtz, S.G. Rogers, R.T. Fraley, 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*. 227:1229–1231.

James, D. J., A. J. Passey, D.J. Barbara and M. W. Bevan. 1989. Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. *Plant Cell Rpt*.

7:658–661.

Janssens, G.A., I.J. Goderis, W.F. Broekaert & W. Broothaerts, 1995. A molecular method for S-allele identification in apple based on allele-specific PCR. *Theor appl Genet.* 91:691–698

Kumar, P.P., C.D. Rao, C.J. Goh, 1996. Ethylene and CO₂ affect direct shoot regeneration from the petiolar ends of *Paulownia kawakamii* leaves cultured in vitro. *Plant Growth Regul.* 20:237–243

Kung, S. and R. Wu. 1993. *Transgenic Plant*. Academic Press Inc.

Lapins, K. O. 1974. Stella, a self-fruitful sweet cherry. *Canadian Journal of Plant Science.* 51: 252–253.

Lin, J.J., Assad-Garcia N, J. Kuo, 1995. Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissues by *Agrobacterium tumefaciens* cells. *Plant Sci.* 109:171–177

Ma, J.H., J.L. Yao, D. Cohen, B. Morris, 1998. Ethylene inhibitors enhance in vitro root formation from apple cultures. *Plant Cell Rep.* 17:211–214

Ma. Y., A. Creanga, L. Lum and P. A. Beachy. 2006. Prevalence of off-target effects in *Drosophila* RNA interference screens. *Nature.* 443:359–363

Martinez J., A. Patkaniowska, H. Urlaub, R. Lührmann, and T. Tuschl, 2002. Single-stranded antisense siRNA guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell.* 110:563–574.

Matsumoto S., K. Kitahara, 2000. Discovery of a new self-incompatibility allele in apple. *HortScience* 35:1329–1332

Matthew L., 2004. RNAi for plant functional genomics. *Comparative and Functional Genomics.* 5:240–244

McClure, B.A., V. Haring, P.R Ebert & M.A. Anderson, 1989. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature.* 342:955–957.

Peterson S. N., P. C. Hu, K. F. Bott and C. A. Hutchison. 1993. A survey of the *Mycoplasma genitalium* genome by using random sequencing. *J. Bacteriol.* 175(24): 7918–7930.

- Sakurai, K., S.K. Brown and N.F. Weeden, 1997. Determining the self-incompatibility alleles of Japanese apple cultivars. *HortScience* 32:1258-1259.
- Sassa, H., H. Hirano & H. Ikehashi, 1992. Self-incompatibility-related RNases in styles of Japanese Pear (*Pyrus serotina* Rehd.). *Plant Cell Physiol.* 33:811-814.
- Sassa, H., N. Mase, H. Hirano & H. Ikehashi, 1994. Identification of self-incompatibility-related glycoproteins in styles of apple (*Malus × domestica*). *Theor appl Genet.* 89:201-205.
- Sassa, H., T. Nishio, Y. Kowayama, H. Hirano, Y. Koba & H. Ikehashi, 1996. Self-incompatibility (S) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. *Mol Gen Genet.* 250:547-557.
- Schneider, D., R. A. Stern, D. Eisikowitch and M. Goldway. 2001. Analysis of S-alleles by PCR for determination of compatibility in the 'Red Delicious' apple orchard. *J. Hort. Sci. Biotech.* 76(5):596-600
- Schwarz D.S., G. Hutvagner, B. Haley, and P.D. Zamore, 2002. Evidence that siRNA function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol. Cell.* 10:537-548.
- Scorza, R., J. M. Cordts, D. J. Gray, D. Gonsalves, R. L. Emershad and D. W. Ramming. 1996. Production transgenic 'Tompson Seedless' grape plants. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121:616-619.
- Small I., 2007. RNAi for revealing and engineering plant gene functions. *Current Opinion in Biotechnology.* 18:148-153
- Song, G.Q., K.C. Sink, 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Plant Cell Rep.* 23:475-484.
- Van Nerum, I., M. Geerts, A. Van Haute, J. Keulemans and W. Broothaerts, 2001. Re-examination of the self-incompatibility genotype of apple cultivars containing putative 'new' S-alleles. *Theor appl Genet.* 103: 584-591.
- Verdoodt, L., A. Van Haute, I.J. Goderis, K.D. Witte, J. Keulemans and W. Broothaerts, 1998. Use of the multi-allelic self-incompatibility gene in apple to assess homozygosity in shoots obtained through haploid induction. *Theor appl Genet.* 96:294-300.
- Waterhouse, P.M., M.B. Wang, T. Lough, 2001. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature.* 441:834-842.

Wesley, S.V., C.A. Helliwell, N.A. Smith, M. Wang, D. T. Rouse, Q. Liu, P. S. Gooding, S.P. Singh, D. Abbott, P.A. Stoutjesdijk, S.P. Robinson, A.P. Gleave, A.G. Green and P.M. Waterhouse, 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal*. 27(6): 581–590.

제5절 분자마커를 이용한 무·배추 무사마귀병 저항성 선발마커 개발

Cho, K.S., HY Hong et al., 2008 Genetic analysis of clubroot resistance in chinese cabbage using single-spore isolates of *Plasmodiophora brassicae* and development of RAPD markers linked to its resistance gene. *J. Crop Sci. Biotech* 11(2): 101–106

Crute, I. R., A. R. Gray, P.Crisp and S. T. Buczacki, 1980 Variation in *Plasmodiophora brassicae* and resistance to clubroot disease in brassicas and allied crops—a critical review. *Plant Breed. Abstr.* 50: 91–104.

Figdore, S. S., M. E. Ferreira, M. K. Slocum and P. H. Williams, 1993 Association of RFLP markers with trait loci affecting clubroot resistance and morphological characters in *Brassica oleracea* L. *Euphytica* 69: 33–44.

Grandclément, C., and G. Thomas, 1996 Detection and analysis of QTLs based on RAPD markers for polygenic resistance to *Plasmodiophora brassicae* Woron in *Brassica oleracea* L. *Theor. Appl. Genet.* 93: 86–90.

Hirai, M., T. Harada, N. Kubo, M. Tsukada, K. Suwabe et al., 2003 A novel locus for clubroot resistance in *Brassica rapa* and its linkage markers. *Theor. Appl. Genet.* 108: 639–643.

Hirai, M. 2006 Genetic analysis of clubroot resistance in Brassica crops. *Breeding Science* 56: 223–229

Jang S.J., et al. 2007 Races and dominant population of chinese clubroot pathogen, *Plasmodiophora brassicae* in Korea. *Res. Plant Dis.* 13(1): 45–49

Kuginuki, Y., H. Ajisaka, M. Yui, H. Yoshikawa, K. Hida et al., 1997 RAPD markers linked to a clubroot-resistance locus in *Brassica rapa* L. *Euphytica* 98: 149–154.

Lander, E. C., P. Green, J.Abrahamson, A. Barlow, M. J.Daly et al., 1987 MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174–181.

Landry, B. S., N. Hubert, R. Crete, M. Chang, S. E. Lincoln et al., 1992 A genetic map of *Brassica oleracea* based on RFLP markers detected with expressed DNA sequences and mapping of resistance genes to race 2 of *Plasmodiophora brassicae* (Woronin). *Genome* 35: 409–419.

Meyers, B. C., A. W. Dickerman, R. W. Michelmore, S. Sivaramakrishnan, B. W. Sobral et al., 1999 Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J.* 20: 317–332.

Piao Z. Y., Y. Q. Deng, S. R. Choi, Y. J. Park, Y. P. Lim. 2004 SCAR and CAPS mapping of CRb, a gene conferring resistance to *Plasmodiophora brassicae* in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Theor Appl Genet* 108:1458–1465

Saito M., N. Kubo, S. Matsumoto, K. Suwabe, M. Tsukada, M. Hirai 2006 Fine mapping of the clubroot resistance gene, *Crr3*, in *Brassica rapa*. *Theor Appl Genet* 114: 81–91

Snowdon, R. J., W. Kohler, W. Friedt and A. Kohler, 1997 Genomic in situ hybridization in *Brassica* amphidiploids and interspecific hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 95: 1320–1324.

Suwabe, K., H. Iketani, T. Nunome, T. Kage and M. Hirai, 2002 Isolation and characterization of microsatellites in *Brassica rapa* L. *Theor. Appl. Genet.* 104: 1092–1098.

Suwabe, K., H. Tsukazaki, H. Iketani, K. Hatakeyama, M. Fujimura et al., 2003 Identification of two loci for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. *Theor. Appl. Genet.* 107: 997–1002.

Suwabe, K., H. Iketani, T. Nunome, A. Ohyama, M. Hirai et al., 2004 Characterization of microsatellites in *Brassica rapa* genome and their potential utilization for comparative genomics in Cruciferae. *Breed. Sci.* 54: 85–90.

Voorrips, R. E., M. C. Jongerious and H. J. Kanne, 1997 Mapping of two genes for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in a population of doubled haploid lines of *Brassica oleracea* by means of RFLP and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 94: 75–82.

Williams, P. H., 1966 A system for the determination of races of *Plasmodiophora brassicae* that infect cabbage and rutabaga. *Phytopathology* 56: 624–626.