

SAMDC 유전자 과다발현을 이용한 내병성,
내염성, 내한성 장미 신품종
개발에 관한 연구

The studies on developing the new cultivar
of roses against various stresses, such as
salts, cold and pathogens, by using
transgenic rose overexpressing SAMDC

형질전환 장미의 특성조사 및 실용화
기술개발에 관한 연구

Characterization and utilization of rose transformants

순천대학교
전남농업기술원

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “SAMDC 유전자 과다발현을 이용한 내병성, 내염성, 내한성 장미
신품종 개발에 관한 연구” 과제 (세부과제 “형질전환 장미의 특성조사 및 실용
화 기술개발에 관한 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 8월 8일

주관연구기관명 : 순천대학교

총괄연구책임자 : 최 상 기

세부연구책임자 : 최 상 기

연 구 원 : 위 수 진

연 구 원 : 장 수 진

연 구 원 : 김 수 영

협동연구기관명 : 전남농업기술원

협동연구책임자 : 기 광 연

연 구 원 : 최 경 주

연 구 원 : 김 홍 재

연 구 원 : 조 명 수

제 1 세부과제

요 약 문

화훼재배현장에서 제기되고 있는 난방비 과다 부담, 염류집적장애, 병원균 만연 등의 문제점을 나타나고 있다. SAMDC 유전자 과다발현 식물체 내병성, 내한성, 내염성을 나타낸다는 것을 본 연구진이 기초연구를 통하여 확립하였다. 따라서 본 연구는 SAMDC 과다발현 재조합 Construct 제조하여 SAMDC 과다발현 형질전환 장미 제조하며 이 과정에서 장미 재분화 및 형질전환 기법 확립하는 것이다.

이를 위해서 우선적으로 상업적으로 이용되는 장미 품종의 꽃의 화질 및 특성을 조사하였다. 그 결과 로즈유미가 본 연구의 목적에 가장 적합한 것으로 판명되었다. 또한 SAMDC 유전자는 다른 유전자와 달리 5'-UTR에 uORF를 가지고 있다. 이것은 유전자 발현에 중대한 영향을 주는 바 이것이 SAMDC 유전자 발현에 미치는 영향을 분석하였다. 장미 형질전환체를 얻기 위한 관련 기술을 개발하였다.

uORF는 정상적인 ORF의 5'-UTR에 존재하는 것으로 peptide가 이제까지 translation을 억제하는 것으로 알려져 있었다. 그러나 본 연구에서 uORF는 translation을 억제하는 것 뿐만 아니라 transcription을 억제하는 것을 확인하였다. 아울러 uORF가 세포 내에서 phosphorylation에 의하여 그 활성이 조절될 수 있다는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 SAMDC의 5'-URT에 존재하는 uORF가 SAMDC의 발현에 매우 중요한 역할을 하고 있다는 것을 의미한다.

장미 형질전환체를 얻기 위하여 기존의 순차적인 실험을 수행하는 방법론을 벗어나 병렬식 접근을 시도하였다. 그 결과 형질전환용 Construct 제조와 함께, embryogenic callus 유도기술, 장미 callus에 유전자를 도입시키는 기술, 그리고 shoot로부터 개체를 만들어내는 기술을 확보하였다. 그러나 callus에서 shoot를 유도하는 기술이 아직 진행 중인 바 이에 대한 추가 연구가 필요하다. 17개의 장미 품종 중 폴리아민 반응성 및 캘러스 유도에 유리한 장미품종을 선발하여 *Agrobacterium*과 peptide 방법을 이용하여 외부 유전자가 도입된 callus를 유도할 수 있었으나 재분화 연구는 아직 진행 중이다. 따라서 형질전환 장미의 환경저항성, 내병성, 개화정도, 화질 및 수확 후 저장성 조사와 형질전환 장미의 항산화효소군 및 PR 유전자군의 유전자 발현 조사는 차후 수행될 것이다.

한편, 장미의 화질과 신선도에 미치는 폴리아민 및 여러 가지 호르몬의 생리적 영향 연구를 병행 수행하였으며, spermine이 신선도 유지에 가장 좋은 효과를 나타내었다. 그러나 절화의 신선도 유지가 미생물 성장 억제와 밀접한 관련이 있기 때문에 spermine의 효과는 아마도 pathogen에 대한 식물의 저항성 증가를 통하여 이루어지

는 것으로 판단된다. 호르몬 중에서 절화의 화질과 신선도 유지에 가장 효과가 좋은 것은 BA였으며, auxin은 부정적인 효과를 나타내었다.

SAMDC 과다발현 형질전환 장미의 내병성, 내한성, 내염성 및 수확 후 신선도와 저장성 증진 확인 및 화아 형성 증가, 개화 촉진, 화질 특성 증진 조사한다. 그리고 SAMDC 과다발현 식물체에서의 항산화 효소군 및 병원균 관련 유전자 발현 및 활성을 분석하고, 형질전환된 장미 유식물의 계통진개와 조절 연구, 유망계통 생산력 검정 및 농가실증 실험, 농가에서 사용 가능한 묘목 생산 연구를 하고자 한다.

SUMMARY

The problems such as salts, pathogens and the cost to heat the green house, have been the major needs in the foriculture in Korea. We have developed the transgenic tobacco overexpressing SAMDC, which have induced the broad tolerances against salts, pathogens, and cold stress. Our previous results provide the possibility that overexpressing SAMDC in roses may improve their capabilities against salts and cold stresses, and pathogens. We, therefore, have pursued this possibility with developing the trasngenic rose overexpressing SAMDC.

Since SAMDC gene contains uORF at its 5'-UTR, we have researched and demonstrates that the expression of SAMDC is under the control of uORF in the transcription as well as the translation. In addition, the level of uORF or its function may be regulated by phosphorylation in a cytosol. Also, SAMDC was increased at the cutflower when cardinals were analyzed through the incubation periods. These findings suggested that uORF might be the important factor to the successful transformation of SAMDC into rose and SAMDC may play the role in the cutflower senescence.

To seek a candidate cultivar for the transfomation of SAMDC, the cultivars of Roses (17 of cultivars) were screened by measuring the capability of shoot formation in lateral bud and of callus formation. In order to develop the techniques to transform a rose, we have pursued the parallel approach, which is the methodology to research all kinds of techniques at the same time. Roseyumi were selected for the transformation and its rooting, inducing callus and transformation were successfully implemented. However, its shoot inducing from the callus is not successful, yet.

And the treatment of spermine and some of plnat hormones (BA and GA) increased the longevity of the flower after cutting. Specially, spermine seems to induce the tolerance against pathogen. Unfortunately, however, the levels of the internal polyamine, such as putrescine, spermidine and spermine, did not explain their correlation with cutflower longevity because of the microbial infections during the incubation periods.

After the transgenic plant will be developed, the tolerance against salts and cold stresses, and pathogens will be defined. Also, the enzymes for the anti-oxidation,

the flowering, the color and quality of petals, and longevity of cutflower will be examined by using the transgenic rose. After these test, the transgenic plants overexpressing SAMDC will be used to produce the saplings which are induced by grafting or others and their botanical traits will be tested to apply them into the field.

제 2 세부과제

요 약 문

1. 형질전환용 장미 유전자원 특성조사 및 품종선발

유전자원 600여종 중 314종에 대해 UPOV 조사항목 중 중요한 화형, 화색, 화경, 꽃잎수, 향기, 가시, 흰가루병 발생정도 등 8개 항목에 대해 조사한 결과 스탠다드가 261종, 스프레이가 53종이었으며 화색은 분홍, 적색, 노랑, 주홍, 백, 이중색이 주종이었으며 초장 71cm 이상인 종이 레드산드라 등 34종이었고 가시는 없는 것이 로얄드림 등 2종, 매우 적은 것이 블랙뷰티 등 50종으로 분류되었다.

꽃잎수는 많은 것이 83종, 향기는 매우 강한 것이 미스터링컨 등 9종 이었으며 흰가루병에 대한 포장 발생정도는 무발생이 상그리아 94 등 3종, 피해가 거의 없는 것이 입생로랑 등 59종으로 분류되었다. 형질전환용 장미 품종선발은 특성조사 품종 중 주요 특성이 우수하다고 판단되어지는 품종 카디날 등 27종과 전남농업기술원에서 육성한 품종 템퍼라 등 11종, 교배종자 26종을 형질전환 시료로 제공하였다.

2. 품종별 장미 화질 및 신선도 유지에 대한 폴리아민의 영향

국내 주 재배 10대 품종인 카디날과 비탈을 대상으로 1mM putrescine, spermidine, 및 spermine 등을 각각 절화에 처리한 후 8일간 배양하면서 신선도 유지와 화질 및 노화정도를 조사한 결과 노화가 약 2일 정도 지연되었으며 절화 후 7일된 경우 대조구는 노화현상이 급격하게 일어나 꽃잎의 말림현상과 마름현상이 있었으나 폴리아민 특히 spermidine과 spermine 처리에서 높은 수준의 수분함량을 보유하고 있었고 꽃잎 말림 현상도 적게 나타났다.

절화일수에 따른 SAMDC 활성을 조사한 결과 절화 1일에 가장 높은 SAMDC 활성을 나타내었으나 일자가 경과할수록 활성이 줄어들었다가 꽃잎이 마르고 노화가 진행되는 시기에 오히려 증가하였다. 절화시점에서 카디날과 비탈의 꽃과 잎에서 폴리아민 함량을 조사한 결과 장미 두 품종 모두에서 putrescine이 가장 높은 함량을 나타내었다.

3. 형질전환 식물체 순화, 번식, 계통전개 및 간이 특성조사

형질전환 식물체를 현재 육성하여 순화 및 형질전환 여부를 확인하는 과정에 있어 확인이 끝나는데 로 유식물체 순화, 계통 육성 및 증식, 특성조사를 수행할 예정이다.

SUMMARY

1. Trait study and cultivar selection for the transformation of roses

In order to obtain UPOV trait data 314 rose cultivars were selected out of more than 600 rose cultivars. Eight important traits were selected and examined such as flower shape, flower color, length of peduncle, length of petals, fragrance, thorn, powdery mildew. As a result 261 standard and 53 spray rose types were collected, and majority flower color were pink, red, yellow, scarlet, white, doubled-color. Plant height of thirty-four cultivars including RedSandra were more than 71cm, and two cultivars including RoyalDream were without a thornless and fifty cultivars including BlackBeauty showed either small sized or less number of thornless. Eighty-three cultivars had abundant petals and nine cultivars including Mr. Lincoln had strong fragrance. Three cultivars including Sangrea 94 showed no symptom of powdery mildew. In addition, fifty-nine cultivars including Yvessanglaurent showed strong resistance to the powdery mildew. Sixty-four cultivars were selected for the rose-transformation.

Twenty-seven cultivars including kardinal with superior traits, eleven cultivars including Tempera developed at jellanando agricultural, research and extension services, twenty-six germplasm were provided for the transformation.

2. Effects of polyamines for the quality control of rose cut flowers

kardinal cultivar ranks in 10 major rose cultivars in the domestic market. Thus it was used in order to test the effect of polyamines. When cutflowers were treated with concentration of 1mM putrescine, spermidine and spermine, and nursed for eight days, the quality of flower was extended for two days. Meanwhile the non-treated samples showed rapid senescence, dryness and curliness of petals after seven days.

The activity of SAMDC was measured throughout the vase lifetime. The activity of it showed highest at 1 day of vase life and then decreased.

Unexpectedly the activity was increased when petals started to wither and dry. At the moment of cutting Cardinal and Vital rose cultivars polyamine contents were measured, and then putrescine content was highest among other polyamine in both cultivars.

3. Acclimatization, propagation, line development and simplified trait observation of transformants

Transformants are being developed under the process of identification of transformation and acclimatization out of in vitro culture. When the system of rose transformation is stabilized, transformed-plantlets will be acclimatized and propagated. Then transformant lines will be developed and botanical traits will be examined.

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	18
1절 연구개발의 필요성	18
1. 기술적 측면	19
2. 경제·산업적 측면	22
3. 사회·문화적 측면	24
제 2 장 국내·외 기술개발 현황	25
1절 국내 관련 기술의 현황과 문제점	25
2절 국외 관련 기술의 현황과 문제점	26
3절 본 연구진의 기술 현황 및 문제점	28
4절 앞으로 전망	34
5절 기술도입의 타당성	35
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	36
1절 연구개발 방법 및 설계	36
1. 장미 형질전환용 construct 제조	36
2. 형질전환 장미 제조	36
3. 형질전환 장미의 환경저항성, 내병성, 개화정도, 화질 및 수확 후 저장성 조사	36
4. 형질전환 장미의 항산화효소군 및 PR 유전자군의 유전자 발현 조사	37
5. 형질전환 장미의 농가보급형 삼목묘/접목묘 개발	37
2절. 연구개발 추진체계	39
3절. 연구수행 방법	40
1. 제 1 세부과제	40
가. SAMDC uORF의 활성 및 기능분석	40

1) GUS 활성 측정	40
2) PCR (polymerase chain reaction) 분석	40
3) <i>In vitro</i> transcription/translation 반응	40
4) <i>In vitro</i> transcription 반응	41
5) <i>In vitro</i> translation 반응	41
6) 총 RNA 분리	41
7) 방사능 표지 probe 제조	42
8) Northern blot 분석	42
9) 핵 추출	42
10) Nuclear run-on assay	43
11) Primer extension 분석을 위한 reverse primer 제조	43
12) Primer extension 분석	44
13) DNA 염기서열분석	44
14) <i>In vitro</i> phosphorylation assay	44
15) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 내로 construct 플라스미드의 도입	45
16) 형질전환 담배의 제조	45
나. 장미 재분화 시스템 확립 및 형질전환 수행	46
1) 장미 형질전환용 Construct 제조	46
2) 장미 macropropagation 시스템 확립	46
3) 장미 형질전환 시스템 확립	47
가) 장미 조직을 통한 형질전환 시스템 확립	47
나) Somatic embryo 유도	47
4) 유도된 장미의 somatic embryo에 <i>Agrobacterium</i> 도입	47
5) Synthetic peptide를 이용한 형질전환	48
2. 제 2 세부과제	50
가. 형질전환 장미의 특성조사 및 실용화 기술개발	50
1) 형질전환용 장미 유전자원 특성조사 및 선발	50
2) 품종별 장미 화질 및 신선도 유지에 대한 폴리아민의 영향	52

4절. 연구수행 결과 53

1. 제 1 세부과제 53

가. SAMDC uORF의 활성 및 기능분석 53

1) SAMDC uORF의 단백질 합성 억제 53

가) SAMDC uORF 및 point mutation을 이용한 재조합 constructs 제조 53

나) *In vitro* transcription/translation (TNT) 반응을 이용한 GUS 활성 변화에 미치는 uORF의 영향 55

다) SAMDC uORF를 포함한 5'-UTR의 영향 59

3) uORF에 의한 mRNA의 steady-state level 조절 60

4) 폴리아민에 의한 feedback inhibition 조절 효과 63

5) SAMDC uORF-GFP protein의 subcellular localization 65

6) SAMDC uORF protein의 phosphorylation 69

가) SAMDC uORF protein의 amino acid 구조분석 69

나) Point-mutation을 이용한 phosphorylation site 확인 71

7) SAMDC uORF의 작용기작 분석 74

가) SAMDC uORF에 의한 ribosome stalling 74

나) uORF protein phosphorylation site의 point mutation에 의한 leaky scanning mechanism 77

8) SAMDC uORF-GFP construct를 이용한 형질전환 담배 식물체와 BY-2 cell 제조 79

나. 장미형질전환 기술 개발전략 및 장미 조직의 배양 82

1) 장미형질전환 기술 개발전략 82

2) 신초를 이용한 식물체 개발 기술 82

3) 장미 조직으로부터 somatic embryo genesis 유도 89

가) 장미의 조직 중 petiole을 이용하여 somatic embryo 를 유도 89

나) 조직 중 분열조직을 이용한 somatic embryo genesis 유도 93

4) 장미의 형질전환 기술 98

가) 형질전환기술 98

나) Peptide를 이용한 형질전환기술 개론	99
(1) <i>Agrobacterium</i> 을 이용한 형질전환	100
(가) 신초 유도과정을 이용한 <i>Agrobacterium</i> 도입	100
(나) 장미 somatic embryo에 유전자를 포함한 <i>Agrobacterium</i> 도입	104
① 장미의 조직 중 petiole에 유전자를 포함한 <i>Agrobacterium</i> 도입	104
② Somatic embryo callus에 <i>Agrobacterium</i> 도입	105
(2) Peptide를 이용한 형질전환	107
(가) Somatic embryo의 형질전환	108
(나) 장미의 조직을 이용한 형질전환	109
(3) 형질전환 방법 확립 과정	112
다. 장미의 화질 및 신선도 유지에 대한 폴리아민의 생리적 역할 규명	117
1) Ethylene 생성량 분석	117
2) SAMDC 활성 분석	117
3) 호르몬에 따른 장미의 신선도 및 화질	122
라. 적요	127
2. 제 2 세부과제	130
가. 형질전환 장미의 특성조사 및 실용화 기술개발	130
1) 형질전환용 장미 유전자원 특성조사 및 선발	130
2) 품종별 장미 화질 및 신선도 유지에 대한 폴리아민의 영향	145
3) 형질전환 식물체 순화, 번식, 계통전개 및 간이 특성조사	148
4) 적요	148
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	149
1절. 연구개발 목표와 내용 및 평가의 착안점	149
1. 연구개발 목표	149
2. 연구평가의 착안점	150

2절. 연구개발 목표의 달성도	151
1. 1차년도 계획대비 진도표	152
2. 2차년도 계획대비 진도표	153
3. 3차년도 계획대비 진도표	154
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	155
1절. 기대효과	155
1. 기술적 측면	155
2. 경제 · 산업적 측면	155
2절. 활용방안	156
제 6 장 참고문헌	157

표차례

표 1. 야생형과 형질전환 식물체 잎 절편의 SAMDC 활성 및 폴리아민 함량	28
표 2. 특허 출원 내역	32
표 3. 유전자원 보유현황	50
표 4. 유전자원별 특성별 조사기준	51
표 5. 호르몬의 구성에 따른 장미의 생장을 비교	83
표 6. 장미 조직에 따른 장미의 신초형성을 비교	87
표 7. 장미종류에 따른 callus의 형성능 비교	91
표 8. 장미의 분열조직을 이용하여 somatic embryo를 유도하는 조건	94
표 9. 분열조직을 이용한 callus 형성을 비교	96
표 10. 장미기관 중 petiole을 형질전환에 사용	105
표 11. 장미를 이용한 형질전환 체계를 갖추기 위한 회의	112
표 12. 장미를 이용한 형질전환 실험	113
표 13. 유전자원의 주요 특성	131
표 14. 장미 형질전환 시험용 개화지 시료 특성	142
표 15. 전남도원 육성장미 형질전환 시험용 개화지 시료 특성	143
표 16. 장미 형질전환을 위한 종자 시료 내역	144

그림 차례

그림 1. 식물체 내에서의 폴리아민과 에틸렌 합성 모식도	20
그림 2. H ₂ O ₂ 처리	30
그림 3. NaCl 처리	30
그림 4. 흰가루병에 대한 저항성 조사	30
그림 5. <i>Phytophthora parasitica</i> pv. <i>Nicotianae</i> 에 대한 저항성 조사	31
그림 6. <i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tabaci</i> 감염에 대한 내병성	31
그림 7. <i>Phytophthora parasitica</i> pv. <i>Nicotianae</i> 에 대한 저항성 조사	32
그림 8. 재조합 Constructs 구성도	46
그림 9. 100ng의 pBI121과 여러 가지 농도의 peptide를 PBS buffer에서 1시간 동안 complex를 형성하도록 방치한 후 gel상에서 관찰	48
그림 10. CSDC9 uORF 및 point mutation을 이용한 재조합 constructs 모식도	54
그림 11. Point-mutated constructs를 이용한 <i>in vitro</i> transcription/translation	56
그림 12. TNT 반응에서 Construct I (A) 과 construct II (B)에 의해	57
그림 13. ³⁵ [S]-methionine을 이용한 <i>in vitro</i> transcription/translation	58
그림 14. CSDC9의 5'-UTR construct 제조 전(A) 후(B)의 전기영동 사진	59
그림 15. 5'-UTR construct를 이용한 <i>in vitro</i> transcription/translation	60
그림 16. Northern blot analysis를 이용한 GUS mRNA의 변화 패턴	61
그림 17. Northern blot analysis를 이용한 mRNA stability 비교	62
그림 18. Nuclear run-on transcription assays.	63
그림 19. GUS 활성화에 미치는 폴리아민의 농도별 영향	64
그림 20. 폴리아민 처리 후 ³⁵ [S]-methionine을 이용한 autoradiography	65
그림 21. 35S:uORF-GFP construct 제조를 위한 PCR products	66
그림 22. 35S:uORF-GFP construct 모식도	67
그림 23. <i>Arabidopsis</i> protoplasts에서 uORF-GFP 세포내 localization	68
그림 24. Point-mutated constructs를 이용한 <i>in vitro</i> transcription/translation	70
그림 25. SAMDC uORF의 <i>in vitro</i> phosphorylation assay	71
그림 26. Serine phosphorylation site를 alanine으로 바꾼 재조합 constructs	72
그림 27. PIII and PIV protein의 <i>in vitro</i> phosphorylation assay	73
그림 28. Toeprint 실험에 사용한 mRNA templates의 모식도	74

그림 29. SAMDC uORF 유무에 따른 toeprint 변화	76
그림 30. SAMDC uORF의 각 point mutant line을 이용한 toeprint	78
그림 31. 형질전환 담배 식물체 앞에서 genomic DNA를 추출한 후	79
그림 32. 형질전환 담배 식물체 앞에서 genomic DNA를 추출한 후 neomycin phosphotransferaseII (NPT II) DNA (A)와 uORF DNA (B)로	80
그림 33. 배양기간에 따른 형질전환 BY-2 cell의 colony 형태	81
그림 34. 장미 품종별 측아로부터의 신초 형성률	84
그림 35. 장미 품종별 측아로부터의 신초 형성률	84
그림 36. 장미 신초형성을 위해 계대배양에 사용한 조직	85
그림 37. 장미 신초형성을 위해 조직별로 분리하여 치상한 상태	86
그림 38. 액아에서 재분화시킨 후 2개월 정도 경과한 카디날과 로즈유미의 신초	88
그림 39. 토양에서 1개월 순화시킨 재분화 장미	89
그림 40. 장미의 petiole 부분을 이용하여 callus 유도과정1	90
그림 41. 장미 petiole로부터 유도되어 4주경과한 로즈유미 callus	92
그림 42. 8주경과한 계대배양중의 로즈유미 callus	92
그림 43. 호르몬 조성을 달리하여 배양한 로즈유미 callus	93
그림 44. 로즈유미를 이용하여 somatic embryo를 유도하는 과정	95
그림 45. 로즈유미에서 somatic embryo를 유도	96
그림 46. 심파스에서 유도된 somatic embryo callus	97
그림 47. 로즈유미에서 유도된 somatic embryo callus	98
그림 48. 형질전환 시킨 후 약 2주 경과한 로즈유미 조직	101
그림 49. 형질전환 시킨 후 약 5주 경과한 로즈유미 조직	101
그림 50. 형질전환 시킨 후 약 7주 경과한 로즈유미를 선별하여 nodculture 배양 ..	102
그림 51. 장미 품종별 형질전환 시킨 후 약 5주 경과하여 측정된 신초 형성률	103
그림 52. 장미 품종별 형질전환 시킨 후 약 6주 경과하여 측정된 신초 형성률	104
그림 53. 형질전환 시킨 후 약 4주 경과한 로즈유미의 somatic embryo callus	106
그림 54. 형질전환 시킨 후 약 8주 경과한 로즈유미의 somatic embryo callus	107
그림 55. Peptide에 의한 DNA delivery의 pathway	108
그림 56. <i>Agrobacterium</i> 과 peptide를 이용한 심파스의 embryo callus에 형질전환 시킨 후 selection medium에서 8주경과	109
그림 57. Peptide를 이용하여 형질전환 시켜 6주정도 경과한 로즈유미	110

그림 58. Peptide를 이용하여 형질전환 시켜 9주정도 경과한 로즈유미	111
그림 59. 카디날 절화장미에서의 에틸렌 생합성 및 폴리아민의 영향	119
그림 60. 비탈 절화장미에서의 에틸렌 생합성 및 폴리아민의 영향	119
그림 61. 노화되는 카디날 꽃에서의 SAMDC 활성 및 폴리아민의 영향	120
그림 62. 노화되는 카디날 잎에서의 SAMDC 활성 및 폴리아민의 영향	120
그림 63. 노화되는 비탈 꽃에서의 SAMDC 활성 및 폴리아민의 영향	121
그림 64. 노화되는 비탈 잎에서의 SAMDC 활성 및 폴리아민의 영향	121
그림 65. 호르몬 BA를 처리 한 후 장미의 화질 및 신선도 비교	122
그림 66. 로즈유미에 BA를 처리한 후 꽃에서 SAMDC activity 측정	123
그림 67. 로즈유미에 BA를 처리한 후 잎에서 SAMDC activity 측정	124
그림 68. 로즈유미에 BA를 처리한 후 꽃과 잎에서 폴리아민 정량	126
그림 69. 유전자원 포장 전경	130
그림 70. 유전자원 특성조사 모습	130
그림 71. 전라남도농업기술원 육성 장미의 특성	143
그림 72. 카디날 폴리아민 처리 7일 경과 후	145
그림 73. 비탈 폴리아민 처리 7일 경과 후	145
그림 74. 카디날 폴리아민 처리 4일 경과 후	146
그림 75. 비탈 폴리아민 처리 4일 경과 후	146
그림 76. 카디날 절화 장미의 절화일수 에 따른 SAMDC 활성 변화	146
그림 77. 카디날 꽃잎에서의 폴리아민 함량	147
그림 78. 카디날 잎에서의 폴리아민 함량	147
그림 79. 비탈 꽃잎에서의 폴리아민 함량 분석	147
그림 80. 비탈 잎에서의 폴리아민 함량 분석	147

제 1 장 연구개발과제의 개요

1절 연구개발의 필요성

인류의 건강 복지를 위한 핵심 산업기술로 인식되고 있는 식물생명공학기술은 유용 유전자를 도입하여 새로운 형질을 갖는 형질전환 식물체(transgenic plant)를 개발하는 것이다. 이러한 기술은 식량생산량 증산, 내병성, 내충성, 내한성, 고품질 농산물 개발 및 다양한 환경에 적응력이 높은 신품종을 개발하는 분자유종기술로서 첨단핵심 기술이라 할 수 있다. 외국에서 이러한 분야의 연구결과가 축적되고 있으며 일부 작물에서는 광범위하게 실용화되고 있다. 이 기술은 미래의 차세대 농업 기술로 각광받고 있으며 세계적인 농업회사들이 관련 기술 개발과 유전자 탐색에 참여하는 등 경쟁이 매우 치열하다.

우리나라 농작물 중 화훼는 경쟁력 제고 가능성은 매우 높은 작물로 인식되어, 비닐하우스나 유리온실을 이용하는 시설원예가 생산 원가 중 연료비가 높은 비중을 차지하고 있다는 단점에도 불구하고 보급이 증가하고 있다. 그러나 장미, 카네이션 등의 화훼작물은 대부분 외국에서 개발된 신품종을 재배하고 있는 바, 국제 정세의 변화로 종자 및 묘목에 대한 높은 로열티를 지불하게 되었다. 또한 염류집적장애와 병충해 취약성 등으로 화훼작물 재배농민들이 어려움을 겪고 있어, 재배 농민의 수익성이 악화되고 있다.

화훼작물 중 장미는 전라남도 작물 수익성 1위이며 화훼작물 중 가장 높은 비중을 차지하고 있는 바, 우리나라 실정에 적합한 장미 품종개발이 시급한 과제이다. 상기 문제점을 극복하기 위해서는 내병성과 내한성 및 내염성이 높으며 꽃의 화질이 좋은 신품종 장미를 빠른 시일 내에 개발하여 농가에 보급하여야 한다. 그러나 기존 육종 기술은 새로운 품종 개발에 장시간 소요되기 때문에, 빠르게 변화하는 시장의 요구에 부응하기 어렵다.

따라서 본 연구에서는 화훼재배현장에서 제기되고 있는 문제점들을 극복하기 위한 방법으로서, 본 연구진이 다년간 수행한 식물생리학과 분자생물학의 기초연구를 통하여 개발한 SAMDC 유전자 과다발현 식물체가 가지는 내병성, 내한성, 내염성 특성을 장미에 응용하고자 한다. 본 기술의 성공적인 적용은 화훼작물 재배 농민의 수익 향상에 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

1. 기술적 측면

폴리아민 (polyamine)은 지구상에 있는 생물체가 모두 함유하고 있는 다가 양이온의 물질로서 아주 다양한 생리적 과정에 관여하고 있다 (Galston, 1997). 이러한 폴리아민은 putrescine, spermidine, 그리고 spermine 으로 구분되는데, 단백질 합성과 핵산합성에 관여하며, 세포분열과 세포신장 및 그 외 식물에서는 세포분화와 기관형성 및 분화에 관여하기도 한다. 폴리아민이 가장 높은 농도로 합성되는 시기는 꽃이 발달하는 시기이며, 특히 최근에는 폴리아민의 노화를 억제하는 작용이 밝혀졌다. 이와 더불어 식물체가 외부의 환경적 스트레스나 병원균 감염 및 칼륨, 인 등의 영양분이 결핍되는 상황에 처하게 되었을 때 폴리아민의 생리적 기능이 더욱 주목받고 있다 (Yamakawa et al. 1998).

폴리아민 합성관 관련된 효소는 arginine decarboxylase (ADC), S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) 및 ornithine decarboxylase (ODC)가 알려져 있다. 이들 유전자의 발현은 (그림 1) 대부분 transcription 단계와 translation 단계에서 조절되고 있다. 세포 내 폴리아민의 양을 정교하게 조절하기 위해서는 이들 유전자 발현을 조절하기 위한 복잡한 기작이 필하다고 판단된다. 정교한 유전자 발현 조절 기작 중의 하나로 5'-untranslated region (UTR)에 upstreaming open reading (uORF)이 발견되었다 (Lee et al., 1997). uORF가 조절하는 방법은 code하고 있는 단백질이 합성되어 폴리아민 합성 유전자의 translation을 억제함으로써 단백질 생성량을 저하시키는 것이다.

변화가 많은 환경에서 서식하는 식물은 특히 식물의 성장과 발달에 지장을 초래하는 환경조건에 노출될 수 있다. 예를 들어, 극단적인 온도 상황, 즉 저온이나 고온의 경우가 있으며 또한 고염분이나 혹은 장기간 동안의 가뭄으로 일어나는 삼투압적인 스트레스와 같은 환경에서 서식하여야 한다. 이러한 스트레스는 지구 역사상 식물 진화의 중요한 선택압으로 작용해 왔으며 작물 서식 및 생산성을 제한하는 가장 중요한 요인이기도 하다. 이러한 무생물적 스트레스와 더불어 식물의 성장이나 발달에 중요한 요인으로서는 바이러스, 박테리아, 곰팡이 등의 다른 생물체가 있다. 이들의 감염도 식물생장을 저해하는 요인으로 작용하고 있다.

이러한 무생물적 스트레스나 병원균이 감염은 폴리아민의 양을 변화시킨다. 특히, 폴리아민 중 특히 putrescine의 양이 가장 극적으로 증가하게 되는데 이러한 환경적 스트레스 상황으로는 K^+ 이온 결핍, 암모늄 이온 과잉, 낮은 pH 상태, 삼투압적 스트레스,

카드뮴 과잉, 이산화황 오염, 무산소상태, 자외선 조사, 오존 오염, 및 병원균 감염 등의 경우가 보고되어 있다 (Kurepa et al., 1998).

스트레스 조건이 주어졌을 때 세포 내에서 증가한 폴리아민의 역할에 대해서는 정확하게 밝혀진 바는 없다. 그러나 쥐의 ODC 유전자가 overexpression된 당근의 형질전환 세포는 고염분과 수분결핍 스트레스에 대한 저항력이 높게 나타났다. 식물체에서 폴리아민이 스트레스에 대한 저항성을 나타내는 근본적인 기작으로는 폴리아민이 oxidative stress에 대한 protector로서 작용하기 때문인 것으로 여겨지고 있다 (Galston et al., 1997; Ye et al., 1997; Kurepa et al., 1998; Yamakawa et al., 1998). 담배 식물체가 tobacco mosaic virus에 감염되었을 때 pathogen-related proteins이 유도되는데 이때에도 salicylic acid와는 독립적으로 spermine이 PR protein을 유도하는 것으로 나타났다 (Yamakawa et al, 1998). 따라서 여러 가지 스트레스 상황의 경우 폴리아민이 스트레스에 의한 피해가 완화되는 것은 잘 알려져 있다고 할 수 있다.

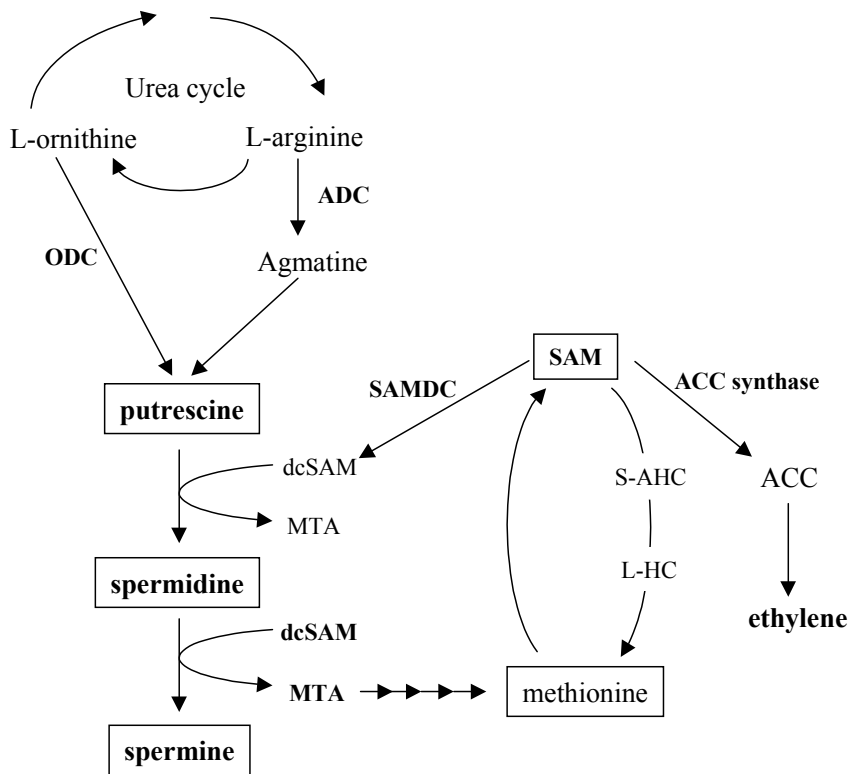


그림 1. 식물체 내에서의 폴리아민과 에틸렌 합성 모식도

식물이 생장에 불리한 환경에 노출되었을 때 손상을 일으키는 가장 중요한 원인은 일시적으로 활성산소군 (active oxygen species, AOS)의 생성이다. Superoxide (O_2^{*-}), hydrogen peroxide (H_2O_2)와 hydroxyl radicals (OH^*) 등의 활성산소군은 막에 결합되어 있는 NADPH-oxidase complex 등에 의해서 합성되며 (Mittler, 1998), 이들의 급격한 양적인 증가는 oxidative stress를 유발한다.

식물이 극단적인 고온이나 저온의 환경에 노출되거나 강한 빛, 가뭄, 오존이나 이산화황 등의 대기오염물질, 자외선, 및 제초제 등과 결합되어 복합적 환경적인 스트레스를 받으면 oxidative stress는 더욱 증가하게 된다. 이에 따라 갑자기 증가하는 활성산소군은 세포 내에서 독성을 나타내어 단백질, 막지질, DNA 및 다른 세포구성성분을 파괴한다. 이러한 예로서 알려져 있는 것은 활성산소군이 단백질의 타이로신, 트립토판, 페닐알라닌, 시스테인 등을 공격하여 carbonyl 유도체를 형성하는 것, macromolecule의 분자 내 혹은 분자간의 이황화다리 형성 등을 통하여 cross linking을 일으켜 단백질을 파괴하는 것, 막을 구성하는 지질의 peroxidation을 일으켜 세포막 손상을 초래하는 것 그리고 엽록체에서의 광합성율을 저하시키는 것 등이다.

폴리아민이 스트레스를 완화시키는 기작에 대해서 명확히 밝혀져 있지 않다. 그러나 폴리아민은 활성산소를 저하시키는 물질로 이용될 수 있다는 보고를 고려할 때, 폴리아민의 작용기작과 활성산소가 연결되어 있다고 판단된다. 따라서 본 연구진은 조직내 폴리아민 생합성량의 증가가 oxidative stress, 고염분, 저온, 수분결핍, 병원균 감염 등의 다양한 스트레스에 대한 저항성 증가를 유도할 수 있을 것이라는 가정 하에, 담배를 모델 식물로 SAMDC 과량발현을 위한 형질전환연구를 실시하여, 광범위한 스트레스 저항성을 확인하였다.

그러므로 이러한 연구결과는 가뭄, 저온, 고온, 수분결핍 등의 환경적인 스트레스와 병원균 감염으로 인한 biotic stress에 광범위하게 저항성을 나타내는 식물(또는 작물)을 개발하기 위한 전략으로 폴리아민의 생합성을 증가시키도록 유전적으로 변형시켜 여러 가지 다양한 스트레스에 대한 저항성을 유도를 활용할 수 있다는 것을 의미한다. 따라서 이를 화훼작물에 적용함으로써 형질전환 기술을 확보하는 것과, 폴리아민 합성 효소의 발현조절 기작에 대한 이해를 증진시키는 것이 필요하다.

본 연구에서는 그 동안의 담배에서 수행된 연구결과를 활용하여 SAMDC의 발현조절 기작을 이해하고, 이 유전자를 내병성, 내한성, 내염성의 제고가 요구되는 시설원예 작물인 장미에 적용하여 광범위한 저항성을 제고시킬 수 있는지를 파악하여 보고자 한다. 그리고 스트레스 저항성이 장미에서 확인될 경우 장기적으로 좀 더 다양한 작물에

적용할 수 있는 최적화 기술로 개발하는 것이다. 궁극적으로 내병성, 내한성, 내염성 등 광범위한 스트레스에 저항성이 제고된 형질전환 작물의 실용화 기술을 개발하여 고품질 신품종의 장미 묘종을 농가에 보급함으로써 농약사용과 연료비용을 절감시키는 저투입형 친환경 농업을 육성하고 농업생산성을 향상시키고자 한다.

2. 경제·산업적 측면

미국내 화훼시장은 150-200억불에 달하는 매우 큰 시장이며, 이중에서도 장미가 35%에 달하는 가장 큰 시장을 형성하고 있다. 1992년부터 1997년까지 대략 15%의 화훼 판매액의 증가를 보여 주고 있어 화훼시장의 잠재력 또한 크다. 일반적으로 화훼작물은 고부가가치 작목으로 선망의 대상이 되고 있으나 꽃 가격에 비해 생산비용이 많이 들고 품질에 따른 가격변동도 대단히 큰 작목들이다.

원예 시설 토양은 연작이 불가피한 바, 연작으로 인하여 물리화학적 악화와 염류의 집적, 토양전염성 병원균의 만연하게 되어 (장미 농가의 경우 생산원가의 3%가 농약비로 지급하면서 3일에 한번씩 농약 살포) 등으로 생산력 증가와 품질 향상은 한계에 도달해 있는 실정이다. 그리고 전쟁 등의 영향으로 최근 유가가 지속적으로 상승하면서 시설원예작물의 생산가격의 30-40%가 난방비로 소요되면서 겨울철 난방비가 원예농가에 커다란 부담으로 작용하여 수익성 악화를 초래하고 있다. 또한 재배시 노동력이 많이 들고 절화의 취급이 비교적 어렵기 때문에 예냉시설 및 저온저장시설, 저온 수송차량의 완비 등 시설이 부족하다. 이에 따라 근래에 시설원예를 포기하는 농가가 점차 증가하고 있는 실정이다.

그럼에도 불구하고 우루과이 라운드 등 국제 변화에 대응하기 위한 작목으로서 원예는 다른 작물에 비하여 경쟁력을 갖추고 있는 바 이를 위한 기술 개발이 필요하다. 우리나라는 중국, 러시아, 일본 등 인구 규모나 경제규모 등이 매우 큰 나라와 인접하고 있다. 이들은 최근 급속한 경제 성장이 이루어지고 있고, 많은 부분에서 발전을 거듭하고 있다. 이들의 경제적 발전은 잠재적인 화훼 소비처임을 고려할 때 화훼를 열악한 재배환경을 개선하고 경쟁력 있는 분야로 발전시켜 나아가야 한다.

그리고 식물 분자생물학 분야의 눈부신 발달로 인하여 여러 가지 외래유전자의 구조와 기능에 대한 연구가 확립되어 있고, 이들의 생리적 효과 및 활성을 형질전환 식물체를 통하여 연구하는 시도들이 많이 이루어지고 있다. 이를 통하여 새로운 기능을 갖고 있는 품종을 빠른 시일 내에 개발할 수 있기 때문이다. 아울러 국가적으로 BT 산업에

대하여 적극 지원하고 있는 바 화훼는 BT산업의 실질적 응용분야로 각광받을 수 있는 작목이기 때문이다.

물론 형질전환 작물에 대한 외래 유전자 도입이 농산물의 이용이 일부 문제화되고 있는 점을 배제할 수 없다. 그러나 현실적으로 형질전환 작물의 재배는 꾸준히 증가하고 있으며 특히 화훼는 식용과는 무관한 관상용이므로 형질전환체 이용가능성이 더욱 높은 작목이다. 생명공학적 기법을 이용한 품종개량의 경우 1) 수확량의 증대, 내한성, 내병충성 및 보존성을 향상시키고, 2) 제초제 농약, 비료의 사용이 절감되어 환경 친화적인 농업이 추진되고, 3) 다양한 식물 조직배양에 의한 고기능성, 고부가가치 물질을 생산하는 이른바 21세기형 농업이 바로 그것이다. 이미 Monsanto, Eli Lilly, Novartis, Calgene과 같은 세계적인 우수회사에서 이러한 연구결과를 상품화로 직접 연결시키고 있다.

따라서 형질전환 기술을 이용한 화훼의 개발은 매우 중요한 과제라 할 수 있다. 이를 수행하기 위해서는 먼저 화훼에 대한 소비자의 요구사항에 대한 분석이 성행되어야 하는 바 본 연구에서는 문헌 조사 및 화훼농가 현장 방문을 통하여 이를 분석하였다. 그 결과 재배자의 요구사항은 특히에 자유로운 품종 및 내한성, 내병성, 내염성, 그리고 절화수명이라고 할 수 있다. 특히 절화수명은 소비자에게도 아주 중요한 요소라 할 수 있다.

본 연구팀은 카네이션 꽃잎에서 분리된 polyamine 합성유전자 중의 하나인 SAMDC 유전자를 이용하여 분자생물학 기법을 활용한 기초연구를 통하여 잎 생장률과 종자형성 증가, 클로로필 함량의 증가, 내한성, 내병성, 내염성 등의 복합 스트레스 저항성을 보이는 것을 확인하였다. 또한 이 유전자는 polyamine 합성을 증가시킬 수 있기 때문에 절화수명 연장에도 관여할 수 있다. 왜냐하면 폴리아민은 에틸렌 합성을 억제시켜 꽃의 노화를 지연시킬 수 있기 때문이다. 또한 본 유전자는 장미와 카네이션의 특정화훼 뿐만 아니라 전반적인 화훼작물, 농산물에 광범위하게 적용될 수 있다는 면에서 큰 의의를 갖는다. 그리고 원예작물 품종의 내한성, 내병성을 향상시키는 연구는 아주 중요한 의미를 담고 있다고 생각한다.

따라서 본 연구진의 연구결과를 활용한 응용연구를 통하여 1) 수확량, 품종개량, 내병성, 내한성, 내염성 및 보존성의 향상, 2) 환경친화적인 농업의 추진을 통하여 농업의 국제적 경쟁력 향상을 유도할 수 있게 될 것이다.

3. 사회·문화적 측면

뉴 라운드에 따른 완전 개방시대를 맞아 우리 농업이 해결해야 할 과제가 많지만, 원예작물의 품종 개발과 신품종 개발 및 생산성 향상은 농업 기반산업의 보전에 큰 역할을 할 수 있다. 더욱이 식물 분자생물학 분야의 발달로 특정 외래유전자의 구조와 기능에 대한 연구가 확립되어 있기 때문에, 이들의 생리적 효과 및 활성을 응용하여 형질전환 식물체를 개발하는 기술은 핵심공동 기반기술의 국내 구축과 국제 시장 진출로 이어질 수 있을 것이다. 국제경쟁력을 보유한 연구결과는 곧 세계시장을 향한 좀 더 능동적인 사업투자로의 변환을 가져올 수 있을 것이다.

제 2 장 국내 · 외 기술개발 현황

1절 국내 관련 기술의 현황과 문제점

국내에서 폴리아민 관련 연구진인 연세대학교 이순희 교수와 조영동 교수는 폴리아민 생합성 관련 유전자의 분리 및 유전자 발현 조절과 생리적 역할 등에 관하여 분자생물학적 방법을 이용하여 식물생리학적 측면에서 많은 연구를 수행하고 있다. 폴리아민의 식물생장 촉진 및 분화와 관련된 연구는 전남대의 황백 교수와 한림대의 한태진 교수가 수행하고 있다. 식물체 조직에서 폴리아민이 노화억제를 나타내는 연구는 원예학적인 측면에서 많은 연구가 수행되고 있다 (건국대 손기철 교수, 농업과학기술원의 이연 박사, 전북대 김재철 교수 등). 1) 토마토 과실에서 폴리아민의 노화 억제, 2) 노지에서 재배한 알로에가 강한 빛에 반응하기 위해 세포내 폴리아민 증가, 3) 배추잎과 상추잎에서의 폴리아민의 노화 지연, 4) 나팔꽃에서 폴리아민을 처리하면 꽃의 노화가 지연되고 꽃눈의 수가 증가하며 정단부 개화가 촉진된다는 보고 등이 있다. 그러나 이러한 연구의 경우 외부에서 처리해야 하는 폴리아민의 농도가 10mM 정도로 고농도인데 이는 실제 생리적인 상황과는 다르다. 따라서 그 동안 수행되어 온 폴리아민의 다양한 생리적 효과를 molecular genetic approach를 통하여 연구할 필요가 있다. 즉, 폴리아민 합성 유전자를 과다발현 혹은 발현 억제 식물체를 만들어 μM 수준의 폴리아민의 세포내 합성량을 인위적으로 증가시켜 연구하는 스트레스 저항성, 노화지연효과 등에 관한 연구를 수행하는 것이 필요하다.

국내에서 환경 저항성과 내병성 등에 관한 연구는 과채류와 주곡작물을 중심으로, 특히, 고추의 역병 및 벼의 도열병, 주요 작물에서의 흰가루병 등에 대한 생리적 기작과 저항성 유전자 탐색 등에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 또한 기존의 육종 기법을 이용하여 여러 환경적 스트레스 및 내병성 작물을 개발하는 연구도 수행되고 있다. 분자육종을 이용하여 내병성 작물 개발도 일부 이루어지고 있으나 아직 초기상태이다. 서울대학교 김병동 교수팀은 오이모자이크 바이러스에 저항성이 있는 형질전환 식물체를 개발한 바 있고, 생명공학 연구소에서도 일부 연구진 및 고려대학교

의 백경희 교수팀이 항산화효소군을 이용한 형질전환 식물체를 제조하여 내한성, 내병성 등에 관한 연구를 수행하고 있다. 그 외 다수의 연구진들이 분자유종을 활용한 스트레스 저항성 작물 개발에 박차를 가하고 있으나 아직 실용화된 연구결과는 없는 편이다. 장미의 분자유종은 생명공학연구소의 유장렬 박사팀에 의해 연구되고 있다.

2절 국외 관련 기술의 현황과 문제점

*Arabidopsis thaliana*에 oxidative stress를 주기 위해서 paraquat를 처리하면 putrescine의 양이 크게 증가하며 paraquat 독성을 완화시키는데 spermidine이 가장 효과적인 protectant의 역할을 하였다 (Kurepa, 1998). *Conyza bonariensis* 와 밀에서는 oxidant stress를 처리하면 putrescine의 세포내 함량이 크게 증가하였으며 폴리아민 생합성 효소들의 활성도 크게 증가하였다 (Ye et al., 1997). 또한 oxidative stress에 저항성이 높은 *Conyza bonariensis*의 biotype에서는 ADC와 ODC의 효소활성이 저항성이 낮은 품종보다 2배정도 높았으며 putrescine의 함량도 월등하게 높게 나타났다.

담배 모자이크 바이러스가 감염된 담배 식물체에서 pathogen-related protein을 유도해 내는 물질이 spermine이며 necrotic lesion-forming leaves에서는 spermine의 양이 건강한 잎보다 20배 이상 높은 것이 관찰되었으며 (Yamakawa et al., 1998), 실제 외부에서 처리한 spermine은 *PR-1*, *PR-2*, *PR-3*, *PR-5* 등의 PR 단백질의 축적을 야기시켰다. 또한 TMV 감염에 의하여 형성된 감염부위도 spermine의 처리에 의하여 감소됨이 관찰되었다. 그 외 쥐에서 분리된 ODC의 유전자를 과다발현 시킨 당근의 현탁 배양세포는 고염분 스트레스와 수분결핍 스트레스에 저항성이 높게 나타났다 (Minocha and Sun, 1997).

폴리아민 유전자를 과다발현 시키거나 발현억제 시킨 형질전환 식물체가 Kumar et al. 등에 의해 제조되어 연구되기는 했으나 이들의 연구에서는 폴리아민의 생합성과 에틸렌과의 상호관계 및 노화지연 정도의 생리적 연구에 집중되었을 뿐 스트레스 저항성 등에 관한 연구는 수행된 바 없다.

위에서 열거한 연구들처럼 단편적인 보고들은 있지만 좀더 전체적이고 체계적인 연구결과들은 아직 보고된 바가 없다. 그러나 위의 연구결과들에서 보듯이 여러 환경요인이 스트레스로 작용할 때 폴리아민의 생합성량의 변화가 유도되며 스트레스에 저항성을 갖는 품종은 저항성이 없는 품종보다 폴리아민의 함량이 높게 나타나며 외부에서 폴리

아민을 처리하여 주변 환경스트레스나 병원균 감염에 높은 저항성이 유도되는 것은 사실이다. 따라서 이들 결과로 폴리아민이 광범위한 스트레스 저항성을 유도할 개연성은 충분하다고 보여진다.

한편, polyamine과 길항작용의 특성을 보이며 합성과정도 일부 공유하는 ethylene도 내병성을 유도할 수 있다. 미국 플로리다 대학의 J. Klee 교수가 1998년에 Plant Cell에 발표한 에틸렌 호르몬을 인지하지 못하는 돌연변이체 (ethylene-insensitive mutant, *nr*)에서의 내병성 연구 (Lund et al., 1998), 캐나다의 워터루 대학의 B.R. Glick 교수가 수행한 에틸렌 분해효소인 ethylene deaminase 유전자의 과다발현 식물체에서의 내병성 및 노화지연효과가 나타났다 (Grichko et al. 2000). 그러나 *etr-1* 유전자가 도입되어 에틸렌을 인지하지 못하는 담배 돌연변이 식물체에서는 오히려 비병원성 곰팡이에 대해 병징이 나타났다 (Knoester et al., 1998). 따라서 식물과 병원균간의 상호작용에 따라 내병성이 다르게 나타나는 것으로 생각된다. 이들 연구진들은 주로 에틸렌의 생합성 측면에서 내병성, 스트레스 저항성 등을 연구하고 있으며 이들 형질전환 식물체에서 폴리아민의 생합성에 대해서는 주목하고 있지 않다. 그러나 본 연구진도 같은 scheme으로 추진한 연구에 의하면 에틸렌 생합성 유전자인 ACC synthase과 ACC oxidase의 발현억제 식물체에서는 외부에서 스트레스가 주어짐에 따라 에틸렌 생합성이 억제됨과 동시에 폴리아민의 함량이 증가하였으며 역시 내병성도 높게 나타났다.

현재 다른 catalase, peroxidase, glutathione S-transferase 등의 항산화 효소군을 이용하거나 혹은 ABA, salicylic acid, jasmonic acid 등과 관련 유전자를 이용하여 생리적 기작을 연구하고 형질전환 식물체를 이용하여 내병성을 비롯한 광범위한 스트레스에 대한 저항성 연구는 활발하게 수행되고 있으나 역시 이를 이용한 실용화는 아직 이루어지고 있지 않다. 그러나 이 분야 연구가 매우 활발하기 때문에 가까운 장래에 실용화된 작물이 다수 개발 될 것으로 생각된다.

3절 본 연구진의 기술 현황 및 문제점

본 연구진은 식물체에서 일어나는 폴리아민의 생합성 조절과 생리적 역할에 대하여 10여년간 연구를 수행하여 왔다. 분자생물학적 연구기법을 도입하여 카네이션, 토마토, 나팔꽃 등에서 폴리아민 생합성 유전자들인 ADC, ODC 및 SAMDC 등을 분리하였고, 최근에는 이들 유전자들을 담배에 도입시켜 폴리아민의 생합성량이 증가된 형질전환 식물체를 확보하였다.

현재까지 연구된 기초 결과에 의하면 카네이션의 SAMDC cDNA를 담배에 형질전환 시켜 SAMDC 유전자를 과다발현시킨 경우 putrescine과 spermidine의 생합성량이 증가하였고, 여러 가지 스트레스에 대한 저항성이 높게 나타났다. 지금까지 SAMDC 유전자를 35S promoter에 연결시켜 constitutive하게 과다발현시킨 식물체를 만드는 연구는 대부분 성숙한 식물체를 얻지 못하였다. 이러한 현상의 원인으로 식물체 내에서 과도하게 합성된 폴리아민의 독성 때문에 조직의 손상이 제안된 바 있다. 그러나 일부 연구에서 이러한 SAMDC 유전자의 과량발현에 성공한 바 있는데 이들의 폴리아민 유전자 과다발현체는 모두 inducible promoter를 사용한 경우였다.

표 1. 야생형과 형질전환 식물체 잎 절편의 SAMDC 활성 및 폴리아민 함량

Tobacco Line	SAMDC activity (nmol CO ₂ mg ⁻¹ protein h ⁻¹)	Free Polyamines (nmol g ⁻¹ . fr. wt)			
		Putrescine	Spermidine	Spermine	Total Polyamines
야생형	0.155±0.024 (100)	57.1±1.8 (100)	18.0±0.6 (100)	5.6±2.2 (100)	80.7 (100)
<i>S16-S-4</i>	0.296±0.038 (191)	296.1±75.0 (519)	142.6±15.2 (792)	174.7±18.3 (3120)	613.4 (760)

* *S16-S-4*은 SAMDC 과다발현 형질전환 식물체임

그러나 본 연구진은 식물체 내에서 정교하게 폴리아민 생합성량이 조절되는 기작으로 uORF가 작용한다는 연구를 밝혀내어 2000년도에 *Plant J.*에 발표한 바 있기 때문에 (Chang et al., 2000) SAMDC 과다발현 construct를 제조할 때에도 자체적으로 translation 단계에서 SAMDC 유전자의 발현을 조절하는 SAMDC uORF를 함께 넣어 제조함으로써 세포내에서 세포독성을 나타내지 않을 수준의 폴리아민이 증가하도록 하

였다. 따라서 uORF를 포함한 SAMDC 유전자의 과다발현 형질전환 식물체를 제조하여 inducible promoter를 사용하지 않고 조직 내 폴리아민의 생합성량이 최대 7.6배 정도 증가한 형질전환 식물체를 제조할 수 있었다 (표 1). 이렇게 제조된 형질전환 식물체에서 형성된 종자는 종자의 수와 질량이 모두 증가하였다.

SAMDC 과다발현 식물체의 잎 절편이 oxidative stress에 대한 저항성을 나타내는가의 여부를 조사하기 위하여 H₂O₂를 처리한 실험에 의하면 야생형의 식물체보다 조직 손상이 월등하게 낮았다. 또한, 백화와 괴사되는 정도도 훨씬 낮았으며 엽록소 양의 손실도 비교적 적은 편이었다 (그림 2). 다양한 농도의 염화나트륨을 처리하여 고염분 스트레스를 처리하면서 T1 progeny를 성장시켜 본 결과 성장정도가 SAMDC 과다발현 형질전환 식물체가 야생형보다 비교적 생장이 높게 유지되었다 (그림 3). 그 외 100 μM ABA를 처리한 경우, 산성용액을 처리한 경우, 혹은 4℃에서 방치한 경우 등에서 보면 형질전환 식물체에서 갈변 등의 세포손상과 노화가 크게 지연되었다.

병원균 감염에 대한 저항성을 조사하기 위하여 야생형의 잎과 SAMDC 과다발현 형질전환 식물체에 흰가루병 (Powdery mildew)의 곰팡이병원균인 *Shpaerotheca pannosa*를 처리했을 때 매우 높은 저항성을 나타내었다 (그림 4). 또한 다른 곰팡이 병원균인 *Phytophthora parasitica* pv. *Nicotianae*를 처리했을 때에도 높은 저항성을 보였다 (그림 5). 그리고 박테리아 병원균인 *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*를 감염시켰을 때에도 SAMDC 과다발현 식물체가 높은 저항성을 보였다 (그림 6). 현재 3종류의 병원균에서 모두 내병성을 나타내었으므로 좀 더 다양한 병원균을 대상으로 내병성을 조사하여 보았을 때에도 높은 저항성을 나타내게 된다면 매우 높은 의미가 있는 결과가 될 것으로 생각한다.

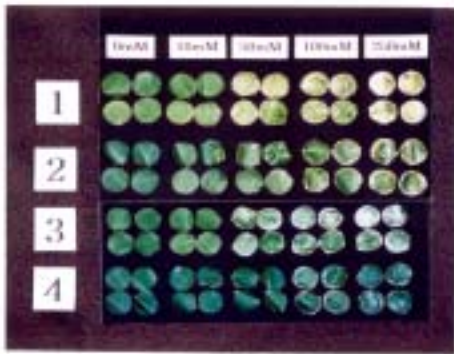


그림 2. H₂O₂ 처리

(0, 10, 50, 100, 250 mM)



그림 3. NaCl 처리

(0, 50, 100, 200, 400 mM)

A: 야생형 담배의 잎 절편

B: SAMDC 과다발현 식물체의 잎 절편

C: 야생형 식물체에 1 mM spermidine 처리

D: SAMDC 과다발현 식물체에 1 mM spermidine 처리



그림 4. 흰가루병에 대한 저항성 조사

왼쪽: 야생형, 오른쪽: SAMDC 과다발현 식물체 (SI6-S-4)

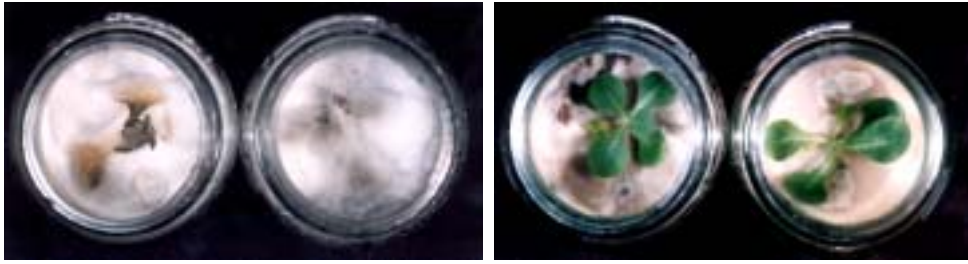


그림 5. *Phytophthora parasitica* pv. *Nicotianae*에 대한 저항성 조사
 왼쪽: 야생형, 오른쪽: SAMDC 과다발현 식물체 (S16-S-4)

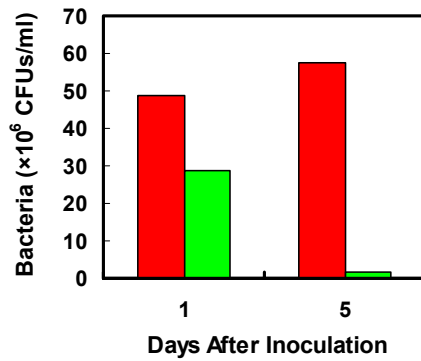


그림 6. *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* 감염에 대한 내병성
 빨간막대: 야생형, 연두색막대: S16-S-4

에틸렌 합성 유전자인 ACC synthase와 ACC oxidase의 유전자를 antisense 방향으로 담배에 도입하여 세포 내 폴리아민 함량을 약 3배 정도 높여 준 형질전환 식물체에 서 내병성을 조사한 결과에서도 매우 높은 내병성을 나타내었다 (그림 7).



그림 7. *Phytophthora parasitica* pv. *Nicotianae*에 대한 저항성 조사
 왼쪽: ACC synthase 발현 억제 식물체, 오른쪽: ACC oxidase 발현 억제 식물체

이상의 결과에서 본 연구진은 폴리아민 생합성 증가 식물체인 SAMDC 과다발현 담배식물체 혹은 에틸렌 생성억제 식물체가 저온, oxidative stress, 고염분 및 acidic stress 등의 환경스트레스 및 병원균 감염 등의 스트레스가 주어졌을 때 광범위하게 스트레스 저항성을 나타내었다. 또한 야생형 식물체에 spermidine을 외부에서 처리하면 스트레스 저항성이 보다 높게 관찰되었다. 따라서 이들 연구결과로 볼 때 SAMDC 과다발현 식물체가 여러 스트레스에 보편적으로 저항성을 갖는 이유는 약 8배 정도 증가한 spermidine이 저항성을 유도하였기 때문인 것으로 여겨진다. 현재까지 얻은 예비결과를 토대로 SAMDC 과다발현 식물체의 제조법을 특허출원하였다 (표 2).

표2. 특허 출원 내역

특허 출원번호	2000년 제 6504호 (10-2000-0006504)
출원 일자	2000년 2월 11일
명칭	SAMDC 유전자를 함유한 제조합벡터 pBI121 및 상기 유전자로 형질전환된 담배 식물체 및 그 형질전환방법
출원자	박기영 외 1인

앞으로 SAMDC 과다발현 형질전환 식물체가 어떻게 다양한 biotic과 abiotic 스트레스에 대해서 저항성을 나타내는지에 관한 구체적이고 체계적인 연구가 수행되어야 할 것이다. 특히 폴리아민의 세포내 함량의 증가가 저항성을 유도하는지에 관한 확인이 필

요하다고 판단된다. 스트레스 저항성이 유도되는 생리화학적, 분자생물학적 연구는 앞으로 스트레스 저항성이 높은 식물체를 개발하는데 기초적인 연구로 활용될 수 있을 것이다. 그리고 담배를 모델시스템으로 사용하여 획득한 스트레스 관련 정보와 생리적, 분자생물학적 지식은 다른 유용한 작물에도 적용할 수 있을 것이다.

4절 앞으로 전망

장미는 꽃이 우아하고 향기로우므로 세계에서 가장 인기 있는 원예식물이다. 장미는 가정이나 건물의 정원에서 많이 가꾸고 있으며 절화용 및 선물용으로도 수요가 많아서 비교적 산업화가 잘 된 식물로 알려져 있다. 장미는 1996년 총 재배면적이 약 580ha, 1999년에는 698ha에 이르렀으며 생산량은 5억 2000만 본을 넘어섰으며 생산액도 900억 원을 웃돌고 있다. 특히 장미 수출량은 꾸준히 늘어 1999년도 장미 수출액은 662만 4,000달러였다. 또한 장미는 소득율이 57%에 달하므로 비교적 소득이 높은 작물이다. 소비 성향도 성별, 연령에 무관하게 가장 선호되는 절화 품목이다. 일본의 경우도 장미는 300억엔에 달하고 있다. 장미는 색깔과 형태가 매우 다양하기 때문에 앞으로 소비가 더욱 늘어날 전망이다. 또한 적정 생육온도 이상에서는 계속 개화되어 주년생산이 가능하기 때문에 농가의 주요 화훼 소득원으로 대표적인 작목이다.

지금까지 장미 시설재배의 문제점으로 지적되고 있는 것 중 하나가 연작에 의한 병해충 및 염류집적의 장해이며, 수년간 연작시 생장과 발육이 불량해지고 수량감소, 품질저하로 이어지는 것이 문제점으로 지적되고 있다. 또한, 동계에는 시설 토양의 지온이 낮아 생장량이 저하되고, 토양으로부터 전염되는 병해와 시비, 제초의 노력이 과다해지는 등의 문제점을 갖고 있다. 특히 장미는 고온성 작물이므로 겨울철 난방비의 부담이 크며 특히 최근 유류가격 상승으로 난방비 부담 (장미 농가의 경우 생산원가 중 비닐하우스는 40%, 유리온실은 30%정도)이 더욱 커지고 있어 시설농가에서 장미 재배에 어려움이 따르고 있다. 그럼에도 불구하고 전라남도에서는 농가 고소득 작목 1위를 기록하고 있다.

현재 영리재배용 장미 품종들은 모두 여러 세대를 거쳐서 여러 장미원종들간의 교잡육종 결과 얻어진 교배종들이므로 대부분의 품종이 특허로서 보호를 받고 있으며 국내에서 재배되고 있는 장미 품종은 모두 외국산이다. 수출용 장미 한 송이당 평균 약 20원 정도의 로얄티가 지불되고 있으므로 (독일에서 수입된 삼목묘의 경우 1\$지급) 장미 재배농가에게는 로얄티가 큰 부담이 되는 실정이다. 2001년부터는 세계무역기구 규정과 국제신품종보호동맹협약에 의해 장미가 품종보호대상작목으로 선정되면 외국산 장미에 더 많은 로얄티를 물어야 하는 실정이다. 현재 농촌진흥청에서는 92년부터 8년간의 연구를 통하여 장미 국산 신품종 5종이 개발되었다. 앞으로 국산 신품종 개발을 통하여 국내 농가의 로얄티 부담을 줄이는 연구가 필요하다.

따라서 본 연구의 목적은 분자육종을 통하여 유용한 유전자를 장미에 도입하는 품종

개량을 통하여 내병성, 내염성, 내한성, 신선도 등이 제고된 국산 신품종 장미를 개발하는 것이며, 장기적으로 장미를 고부가가치 화훼작목으로 전환시켜 화훼농가의 생산성을 높이고 농가소득 향상에 크게 기여할 수 있을 것이다.

5절 기술도입의 타당성

현재 전세계적으로 대기오염, 사막화, 지구온도 상승, 가뭄 등 자연환경변화가 뚜렷하게 일어나고 있으므로 내한성, 내병성, 내염성이 높은 작물을 개발하려는 노력과 연구는 아주 활발하게 일어나고 있는 편이다. 일부 특정한 환경요인에 대처하는 저항성이 높은 작물을 개발하는 연구뿐 만 아니라 좀더 광범위한 환경요인에 복합적으로 저항성을 식물이 갖게 하고자 하는 분자생물학적 연구도 또한 활발하게 진행되고 있다. 그러나 이들 연구들은 대부분 몬산토, 노바티스 등의 거대자본의 지원을 받아 이루어지고 있으므로 이들 저항성 작물 연구가 완료되어 상용화 할 경우에는 엄청난 기술도입료를 요구할 것이다.

우리나라의 농업생산성은 극히 낙후한 편이지만 천혜의 풍부한 식물 유전자 자원을 소유하고 있는 나라로서 비교적 화훼작물에 대한 국가경쟁력의 잠재력은 높은 편이다. 현재 화훼자원의 고품질화와 상업화가 비교적 낙후한 편이므로 유전자 변형 기법을 사용하여 화훼작물들의 품질을 개량하여 고품질화 한다면 화훼작물의 국가 경쟁력은 매우 향상될 것으로 예상된다.

본 연구에서 이용되는 SAMDC 유전자의 경우 카네이션에서는 최초로 본 연구과제 팀에 의해 밝혀진 연구결과이며 SAMDC 과다발현 식물체와 에틸렌 합성 억제 식물체에서의 스트레스 저항성 및 내병성 등에 관한 연구는 2001년에 국제학술지인 *Plant Physiology*와 *Plant Cell Physiology* 에 각각 게재될 예정이므로 외국 기술의 도입은 필요하지 않으며 국내에서 이미 확보된 기초연구를 활용하여 연구하는 것이 훨씬 효율적이라고 생각한다. 본 연구가 성공적으로 수행된다면 국내 특허와 국제특허를 동시에 획득할 수 있을 것으로 생각된다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

1절 연구개발 방법 및 설계

1. 장미 형질전환용 construct 제조

본 연구진은 uORF 라는 translational inhibitor를 함유하고 있기 때문에 SAMDC 과다발현 재조합 construct를 가지고 있으며, 이 유전자가 형질전환 담배 식물체는 polyamine의 양의 약 7.5배 정도 증가한다. 아울러 spermidine의 처리에 의하여 일반 담배에서 나타나는 스트레스 지연효과는 상기 형질전환체에서 나타났다.

따라서 본 연구에서는 이미 확보하고 있는 카네이션 SAMDC uORF 및 SAMDC 유전자를 포함하고 있는 Construct I을 장미에 형질전환시켜 SAMDC 과다발현 식물체를 1차적으로 얻은 후 uORF가 제거된 SAMDC construct (Construct II)를 제조하여 SAMDC 과다발현 식물체에 재도입시킴으로써 SAMDC 과다발현을 좀 더 증강시키고자 하였다 (그림 8). 그러나 과제 중간 평가에서 Construct II의 제조 필요성에 대하여 논의하여 Construct I에 집중하여 연구하도록 결정되었다. 따라서 Construct I을 장미에 형질전환하는 연구를 수행하고자 하였다.

2. 형질전환 장미 제조

장미 형질전환 기법은 우리나라의 경우 생명공학연구소의 유장렬 박사팀이 성공을 거두었으며 외국에서는 플로리겐사가 성공하여 1998년도에 특허 등록 하였다. 본 연구에서는 Construct I을 도입시키고자 하였다. 이들 construct는 국내에서 개발된 것으로 적당한 장미품종인 로즈유미 품종을 이용하여 장미의 정단분열조직이나 줄기의 node 혹은 잎 절편에 *Agrobacterium*을 감염시킨 후 형질전환 식물체를 유도하고자 하였다.

3. 형질전환 장미의 환경저항성, 내병성, 개화정도, 화질 및 수확 후 저장성 조사

SAMDC 과다발현 장미의 잎 절편에 oxidative stress로 다양한 농도의 H₂O₂, 염화나

트륨, 100 μ M ABA, pH 3.0의 5 mM potassium phosphate (acidic stress), 저온 등의 환경 스트레스를 처리하여 엽록소 손실량, 괴사정도 등의 저항성을 조사하고자 하였다. 또한 내병성을 조사하기 위해서는 장미재배에서 가장 문제가 되고 있는 흰가루병 (Powdery mildew)의 곰팡이병원균인 *Shpaerotheca pannosa*, 다른 곰팡이 병원균인 *Phytophthora parasitica* pv. *Nicotianae*, 박테리아 병원균인 *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*를 감염시켜 보고자 하였다. 개화정도와 화질은 기존 재배되고 있는 장미 품종과 비교하여 꽃의 색, 꽃의 크기, 꽃대의 길이, 꽃잎 수 등의 질적 형질을 분석하며 꽃의 수명과 수확 후 저장성도 분석하고자 하였다.

4. 형질전환 장미의 항산화효소군 및 PR 유전자군의 유전자 발현 조사

식물이 병원균이나 스트레스에 처했을 때 생성되는 활성산소군은 superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidases (APXs), glutathione peroxidases (GPXs) 및 catalase 등의 효소적인 방법과 그 외 비효소적인 방법에 의한 detoxification 기작에 의해 효과적으로 제거된다. 폴리아민의 생합성이 크게 증가된 형질전환 식물체가 내병성, 내염성, 내한성을 광범위하게 보편적으로 나타내기 위해서는 환경적인 스트레스에 의해서 생성된 활성산소군이 제거되는 것이 반드시 필요하기 때문에 형질전환 장미 식물체에서 항산화효소들의 분자생물학적 발현 변화를 조사할 필요성이 있다. Ascorbate peroxidases (APXs), MSR, methionine sulfoxide reductase; GPx, glutathione peroxidase; CAT, catalase; RSH-Px, thiol-specific peroxidase; NOS, nitric oxide synthetase; SOD, superoxide dismutase; GST, glutathione transferase 등의 항산화효소 유전자의 발현을 mRNA 수준에서 분석하고자 하였다.

이와 함께 박테리아와 바이러스 및 곰팡이 등의 병원균을 형질전환 장미 식물체에 감염시킨 후 위와 동일한 활성산소군의 생성, 항산화효소 발현 및 PR 단백질의 생성 등을 분석하고자 하였다.

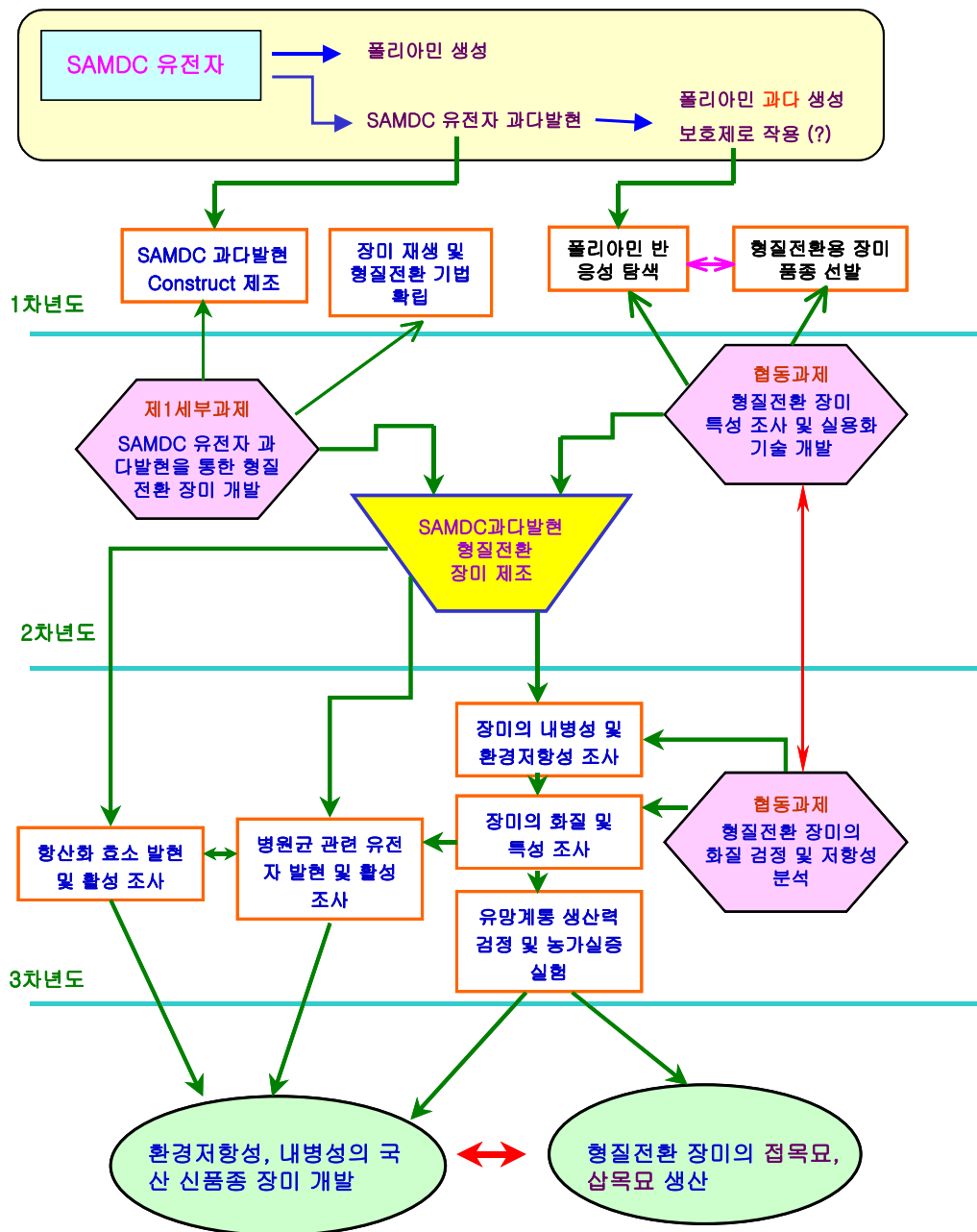
5. 형질전환 장미의 농가보급형 삽목묘/접목묘 개발

폴리아민 생합성량이 증가된 형질전환 장미에서 내병성, 내한성, 내염성 및 수확 후 신선도 유지 및 저장성 증진이 확인되면 곧 친환경적 고품질 신품종 장미의 대량보급을 위한 실용화 기술개발을 추진하고자 하였다. 특히 본 연구에서 개발된 신품종 장미는

화훼 농가에 보급 가능한 신품종 접목묘 혹은 삽목묘로 개발하고자 하였다.

이에 성공한다면 병원균에 저항성이 높아 농약 사용량이 절감되는 효과를 얻을 수 있으며 내염성은 연작피해를 줄일 수 있을 것이며 내한성은 동계에 땅의 저온 상태에서도 비교적 동해를 적게 받음과 동시에 에너지 비용을 낮춰 생산비 절감을 유도할 것이다. 이를 통하여 작물 생산성을 제고시키고 시설원예에서 적용가능한 저비용 고효율의 화훼작물을 개발하고자 하였다.

2절. 연구개발 추진체계



3절. 연구수행 방법

1. 제 1 세부과제

가. SAMDC uORF의 활성 및 기능분석

1) GUS 활성 측정

Promega의 transcription과 translation coupled (TNT[®]) wheat germ extract system을 사용하였다. Cold methionine (1mM)을 기질로 30℃에서 90분 동안 반응한 후, 합성된 생성물에 200 μ l의 GUS assay buffer (50mM NaHPO₄, pH 7.0, 10mM β -mercaptoethanol, 10mM Na₂EDTA, 0.1% sodium lauryl sarcosine, 0.1% Triton X-100, 2mM MUG)를 첨가하여 다시 37℃에서 60분간 반응을 시켰다. 0.2M Na₂CO₃ 용액을 첨가하여 반응을 중지하고, 활성은 spectrofluorometer (365 nm excitation / 456 nm emission)를 이용하여 형광도를 측정하였다.

2) PCR (polymerase chain reaction) 분석

5'-UTR이 포함된 construct를 제조하기 위해서 *Sac*II과 *Bam*HI site가 연결된 sense와 antisense primer와 *pCSDC9*을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 pre-denature는 94℃에서 5분, denaturation은 94℃에서 1분, annealing은 60℃에서 2분, elongation은 72℃에서 2분, post-elongation은 72℃에서 10분의 조건으로 35 cycle 수행하였다. PCR을 위해 사용된 primer의 염기서열은 sense primer의 경우 5' - CCGCGGATCAAATAATTTCTCCATCT - 3'이었고, antisense primer는 5' - GGATCCTGCAATGTTCTCTTGAGGTT - 3'이었다. PCR 생성물은 1% agarose gel에 전기영동 하여 DNA 절편의 크기를 확인하였다.

3) *In vitro* transcription/translation 반응

Promega의 transcription과 translation coupled (TNT[®]) wheat germ extract system을 사용하였다. T3 RNA polymerase와 wheat germ extract를 사용하여 30℃

에서 *in vitro* transcription/translation 반응을 수행하였다. 이 때 DNA는 1 μ g을 사용하였고 합성되는 단백질은 ³⁵[S]-methionine (1000Ci/mmol)을 사용하여 radio-labelling 시켰다. SDS-PAGE sample loading buffer와 섞어 곧바로 100 $^{\circ}$ C에서 10분간 끓이고 SDS-PAGE 전기영동을 수행하였다. 전기영동 후 gel은 Coomassie Brilliant Blue R-250로 염색하고, 불필요한 염색은 5% methanol과 7.5% acetic acid 용액에서 탈색시켰다. 그리고 amplify (Amersham) 용액에 30분간 담가 두었다가 gel dry한 후 -70 $^{\circ}$ C에서 X-ray film에 감광시켰다.

4) *In vitro* transcription 반응

Promega의 riboprobe[®] T3 *in vitro* transcription system을 사용하였다. T3 RNA Polymerase를 사용하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 *in vitro* transcription 반응을 하였으며 이 때 DNA는 1 μ g을 사용하였다. 반응 후 RQ1 RNase-Free DNase를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 배양함으로써 template DNA를 제거하였다. DNA 제거 후 phenol extraction과 ethanol precipitation을 수행하였고, 추출된 mRNA는 DEPC가 처리된 탈이온수에 용해시켜 실험에 사용할 때까지 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

5) *In vitro* translation 반응

Promega의 wheat germ extract kit를 사용하였다. *In vitro* transcription 반응으로 추출한 mRNA를 사용하여 potassium acetate 53mM, RNasin[®] ribonuclease inhibitor 40u를 첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 반응시켰다.

6) 총 RNA 분리

Chomczynski와 Sacchi의 방법 (1987)을 수정하여 사용하였다. 반응이 중지된 sample에 0.5ml RNA extraction buffer (4M guanidinium thiocyanate, 25mM sodium citrate, 0.5% sarkosinate, 0.1M β -mercaptoethanol)를 첨가하여 30초간 혼합한 후 3M sodium acetate (pH 4.0) 0.05ml을 넣고 다시 30초간 재혼합하였다. 물과 포화된 페놀 0.5ml을 첨가하여 30초간 섞고 chloroform : isoamylalcohol (24 : 1, v/v) 0.1ml을 넣고 다시 30초간 혼합하여 상온에서 3000rpm으로 20분간 원심분리하여 상층액을 새로운 tube로 옮겨 동량의 cold ethanol을 첨가한 뒤 -20 $^{\circ}$ C에서 24시간 방치하였다. 이것을 10,000rpm으로 4 $^{\circ}$ C에서 20분간 원심분리하고, 침전물을 DEPC 0.5ml에 녹인 후 10M LiCl 150 μ l을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 방치하였다. 그 후에 4 $^{\circ}$ C에서 15,000rpm으로

원심분리하여 얻은 침전물을 70%의 ethanol로 2번 씻은 뒤에 diethyl pyrocarbonate (DEPC)에 용해시켜서 사용하였다.

7) 방사능 표지 probe 제조

Random-primed DNA labelling kit (Boeringer Mannheim)를 이용하였다. DNA 주형 20-100ng을 100℃에서 10분간 변성시킨 후 hexanucleotide mix를 붙여 Klenow fragment로 37℃에서 1시간 반응시켜 [α -³²P] dCTP (3000Ci/mmol)로 DNA를 표지하였다. 반응이 끝난 후 QIAquick Nucleotide Removal Kit(Qiagen)를 사용하여 방사능으로 표지된 probe만 순화하여 사용하였다.

8) Northern blot 분석

RNA 전기영동은 formaldehyde 변성 gel을 사용하였다. Formaldehyde와 증류수, 5×gel running buffer(0.1M MOPS, pH 7.0, 40mM sodium acetate, 5mM EDTA, pH 8.0)가 1 : 3.5 : 1.1의 비율이 되도록 섞은 1%의 agarose gel을 사용하였으며 RNA 시료는 RNA와 formamide, formaldehyde, 5×gel running buffer를 4.5 : 10 : 3.5 : 2의 비율로 섞어 65℃에서 10분간 변성시킨 후 전기영동을 하였다. 전기영동이 끝난 후 Hybond-N+ membrane(Amersham)에 RNA를 전이시켰고, UV cross linker로 고정시켰다. 이 membrane을 prehybridization 용액에 담아 42℃에서 prehybridization시켰다. 4시간이 지난 후 방사능으로 표지한 probe를 열 변성시켜 넣었다. 18시간 이상이 지난 후 hybridization 용액을 버리고 membrane을 용액 I (2×SSC, 0.1% SDS)으로 실온에서 2번, 용액 II (0.5×SSC, 0.1%SDS)로 65℃에서 30분간 2번 세척한 후 X-ray 필름에 감광시켰다.

9) 핵 추출

액체질소로 얼린 10g의 담배 seedling을 40-50ml의 nuclear isolation buffer [NIB; 2.5mM Tris-Cl, pH 8.5, 1mM MgCl₂, 2.5% Ficoll (w/v), 5% dextrose (w/v), 8.55% sucrose, 0.07% 2-mercaptoethanol (v/v)]를 넣고 마쇄한 후, 100μm이하의 mesh 6층을 통과시켰다. 4℃에서 10분간 1,000g로 원심분리 후 상층액을 조심스럽게 버리고 pellet을 15ml의 NIB에 녹였다. 이 추출액을 25%와 75%의 두 층으로 이루어진 percoll (용매는 NIB) 용액 위에 조심스럽게 올려놓고 swinging bucket 원심분리기를 사용하여 4℃에서 30분간 7,000g로 원심분리 하였다. 25%와 75%의 percoll 층 사이에

생긴 하얀색의 핵 층을 wide tip을 이용하여 새 tube에 옮기고 3배 부피의 NIB와 섞어준 다음, 다시 4°C에서 10분간 1,000g로 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 20ml의 NIB에 pellet을 녹인 후 핵의 상태와 수를 400배의 광학현미경으로 확인하였다. 4°C에서 10분간 1,000g로 원심분리를 반복한 다음, 핵으로 이루어진 pellet을 150-250 μ l의 nuclear resuspend buffer[NRB; 5mM Tris-Cl, pH 8.5, 0.5mM MgCl₂, 0.069% 2-mercaptoethanol (v/v), 10% glycerol (v/v), 1mM PMSF]에 녹이고 wide tip으로 50 μ l씩 분주하여 액체질소로 얼려 -70°C에 보관하였다.

10) Nuclear run-on assay

얼음에서 핵 추출액을 해동한 후 1 \times transcription buffer(20mM HEPES, pH 7.8, 0.075M (NH₄)₂SO₄, 2.5mM MgCl₂), 10% glycerol, 각각 0.5 mM의 ATP, CTP, GTP, 1mM dithiothreitol (DTT), 100 μ Ci α -[³²-P] UTP, 100U RNasin을 순서대로 첨가하고, 핵의 수가 5 \times 10⁶이 되도록 증류수로 최종부피를 맞추었다. 30°C에서 30분 동안 반응시키면서 1 μ l의 반응시료를 liquid scintillation counter로 α -[³²-P] UTP의 incorporation rates를 확인하였다. 2 μ g DNaseQ (RNase free)와 50 μ g tRNA (RNase free)를 첨가하여 반응을 중지시킨 후 30°C에서 15분간 더 반응시켰다. 20 μ l의 1 \times transcription buffer를 첨가한 후 같은 부피의 phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1)을 넣고 1분간 vortex를 수행한 후에 13,000rpm으로 10분간 원심분리 하여 transcripts를 추출하였다. 수용액층을 새 tube에 옮기고 최종농도가 2M의 NH₄⁺-acetate와 2.5배 부피의 100% EtOH을 넣어준 다음 -20°C에서 overnight 동안 방치 하였다. 이 후 4°C에서 20분간 15,000rpm으로 원심분리 한 다음 70% EtOH로 pellet을 세척 후 건조하여 50 μ l의 증류수 또는 formamide에 용해시켰다. Liquid scintillation counter로 방사능을 확인하여 hybrid 용액에 2 \times 10⁶ cpm/ml의 농도가 되도록 probe를 넣었다.

11) Primer extension 분석을 위한 reverse primer 제조

Primer extension 분석을 위해서 reverse 방향으로 primer를 주문 제작하였다. GUS primer는 GUS start codon으로부터 80mer 떨어진 곳에 위치하며 5' - CACCAACGCTGAATTCCACAG - 3'이다.

12) Primer extension 분석

Wang and Sachs의 방법 (1997)을 사용하였다. 3 μ l의 translation reaction mixture (RNA 120ng)와 5.5 μ l의 reverse transcription reaction mixture를 첨가하여 50 $^{\circ}$ C에서 2분 동안 heating 시킨 후에 즉시 얼음에 두었다. 여기에 1 μ l의 32 P-labeled primer (2 \times 10⁶ cpm)를 첨가하고 37 $^{\circ}$ C water bath에 5분 동안 반응시켰다. 그리고 0.5 μ l의 100U Superscript II RNase H- reverse transcriptase (Gibco BRL)를 첨가하고 다시 37 $^{\circ}$ C water bath에서 30분 동안 반응시켰다. 반응 중지는 10 μ l phenol-chloroform 을 첨가하여 수행하였고, 상층액을 옮긴 후 같은 부피의 DNA sequencing stop solution (91% formamide, 20mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol FF) 을 첨가하였다. Sample은 85 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 heating 시킨 후에 얼음에서 냉각하였고 8% acrylamide / 7M urea sequencing gel에 loading 해서 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 fixing 용액 (10% acetic acid, 12% MeOH)에서 1시간 동안 fixing 시켰고, dryer로 gel을 옮겨서 70 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 gel을 건조하였다. 충분히 건조된 gel을 autoradiography에 이용하였다.

13) DNA 염기서열분석

DNA 염기서열 확인은 sequenase ver. 2.0 (USB)을 사용하여 dideoxy chain termination 방법 (Sanger et al., 1977)을 이용해서 수행하였다. plasmid 5~10 μ g을 alkali denaturation시켜 DNA sequencing primer 1 pmole을 붙인 후 상온에서 3~5분 동안 [35 S]dATP로 표지반응 후 dideoxynTP를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 15~30분 동안 extension/termination 반응을 시켰다. 그리고 sequencing gel (8% acrylamide/7M urea) 전기영동을 수행한 후 X-ray 필름에 감광시켜 염기 서열을 결정하였다.

14) *In vitro* phosphorylation assay

Yong-Qiang 등의 방법 (2000)을 변형해서 사용하였다. 4 $^{\circ}$ C에서 각각의 카네이션 잎1g을 1ml의 TEF buffer (20mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1mM sodium orthovanadate [Na₃VO₄], 25mM sodium fluoride [NaF], 0.1mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], 0.1mM EGTA)를 첨가하여 막자사발을 얼음 속에 놓고 homogenization 시킨 후 extract를 2-4겹의 거즈를 사용하여 filter 하였다. 그리고 원심분리 (18,000g, 3분, 4 $^{\circ}$ C)한 후에 supernatant를 kinase source로 사용하였다. 즉, 추출물 (kinase source) 2 μ g과 protein 4 μ g에 최종부피 50 μ l인 [γ - 32 P]ATP 4 μ Ci, 50mM Tris-HCl

[pH 7.0], 1mM DTT, 10mM MnCl₂, 20μM unlabeled ATP를 첨가하여 실온에서 30분 동안 반응시킨다. 반응 중지는 4×SDS sample buffer 15μl를 첨가하여 10분 동안 boiling하여 수행하였고, 이 후에 PeptiGel (Elpis biotech)을 수행하였다. 그리고 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색 후에 gel을 건조하여 autoradiography를 수행하였다.

15) *Agrobacterium tumefaciens* 내로 construct 플라스미드의 도입

5ml의 YEP 액체배지 (bacto tryptone 10g, yeast extract 10g, NaCl 5g/l)에 LBA4404를 접종하여 28℃에서 16시간 이상 배양하였다. 이 배양액 중 2ml을 50ml의 YEP 액체배지에 첨가하여 OD₆₀₀의 값이 0.75가 되었을 때까지 배양한 후 얼음에서 3분간 반응시켰다. 그 후 배양액을 원심분리 (4℃, 3,000g, 3분)하여 세포를 수거하고 1ml의 20mM CaCl₂를 첨가하여 세포를 현탁하여 competent cell을 만든 후 100μl에 1μg의 플라스미드 DNA를 첨가하여 액체질소로 1분간 급냉시켰다. 37℃ water bath에서 5분간 반응시킨 후 1ml의 YEP 액체배지를 첨가하여 28℃, 100rpm에서 3-4시간 배양하고, kanamycin (25μg/ml)이 첨가된 YEP 고체배지에 도말하였다. 배지는 28℃, 암 상태에서 2일간 배양하였다.

16) 형질전환 담배의 제조

화분에서 재배한 건강한 WT 담배 잎을 Lax (치아염소산 나트륨) 1%에 5분간 멸균하여 증류수로 5회 이상 씻어주었다. 잎을 직경 5-7mm 정도로 절단하여 MS104 (MS/BAP1ppm /NAA0.1ppm /pH5.8)에 잎 윗면을 배지에 접하도록 치상하여 2일 동안 25℃ 암소에서 배양하였다. 동시에 kanamycin (25μg/ml) + rifampicin (50μg/ml) + streptomycin (50μg/ml)이 첨가된 5ml의 YEP 액체 배지에 형질전환된 *Agrobacterium*을 접종하여 25℃, 180rpm에서 1일간 배양한 후 이중 2.5ml을 kanamycin (25μg/ml)+rifampicin (50μg/ml)+ streptomycin (50μg/ml)이 첨가된 100ml의 YEP 액체배지에 다시 접종하여 O.D₆₀₀이 1.5가 되도록 배양하였다. 배양한 100ml의 *Agrobacterium* 균액에 전배양한 잎절편을 넣어 잠시 동안 감염시킨 후 균액을 제거하고 동일조성의 MS104배지에 치상하여 2일 동안 25℃ 암소에서 공조배양 하였다. 공조배양이 끝난 후 잎절편을 cefotaxime (250μg/ml)이 첨가된 MS104에 옮겨 1주일간 암소에서 키운 후 kanamycin (100μg/ml)이 첨가된 MS선별배지에 옮겨 주었다. 그 후 2주마다 신선한 MS선별배지에 계대배양 하여 shooting 및 rooting을 유도한 후

hardning 과정을 거쳐 큰 화분으로 옮겨 주었다.

나. 장미 재분화 시스템 확립 및 형질전환 수행

1) 장미 형질전환용 Construct 제조

본 연구에서는 그림 8에 제시한 construct 중 이미 확보하고 있는 카네이션 SAMDC uORF 및 SAMDC 유전자를 포함하고 있는 Construct I을 사용하였다.

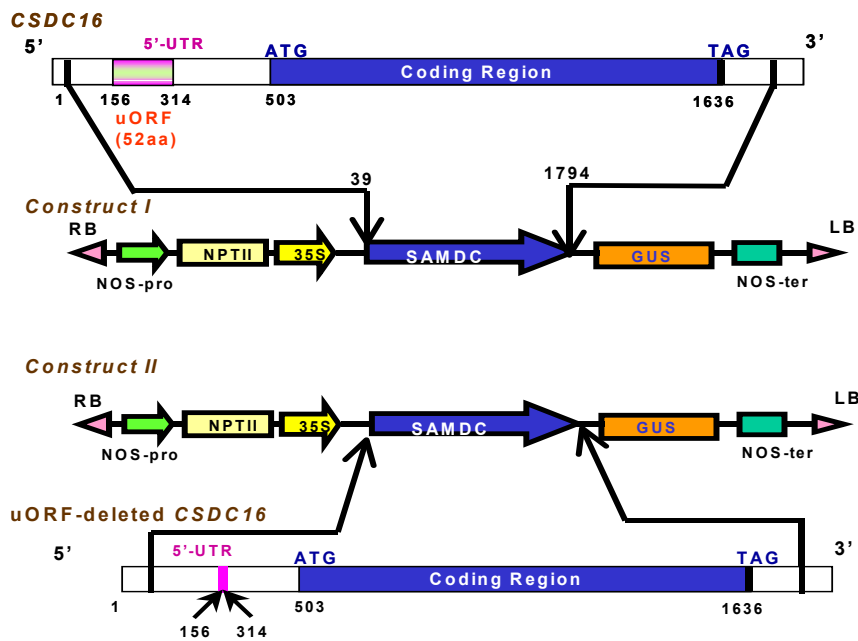


그림 8. 재조합 Constructs 구성도

2) 장미 macropropagation 시스템 확립

장미의 마디에서 측아를 채취하여 멸균한 후 3mg/l의 BA, 0.5mg/l의 2,4-D가 첨가된 MS 배지와 2mg/l의 BA, 0.5mg/l의 NAA가 첨가된 MS 배지에 치상하여 2달 동안 2주 간격으로 계대 배양하여 신초형성과 캘러스 형성정도를 측정하였다. 각각 장미의 종류에 따라 3mg/l의 BA, 0.5mg/l의 2,4-D가 이 첨가된 MS 배지와 2mg/l의 BA와 0.5mg/l의 NAA가 첨가된 MS 배지에서 성장율이 약간씩 차이가 있었으나 대체

적으로 신초가 잘 형성되는 것을 확인 할 수 있었다. 신초가 형성된 경우 신초를 분리하여 1mg/l의 2,4-D가 첨가된 MS 배지인 뿌리 유도배지에 치상하여 뿌리발달을 유도하였다. 뿌리가 잘 형성된 기내 배양된 어린식물체는 작은 크기의 화분에 옮겨 순화시킨 후 큰 화분에 옮겨 꽃의 개화까지 관찰하였다.

3) 장미 형질전환 시스템 확립

가) 장미 조직을 통한 형질전환 시스템 확립

장미 형질전환을 위하여 장미의 측아, 잎, petiole 등의 조직을 이용하여 다양한 호르몬 조건에서 캘러스 형성 정도, 신초형성 정도 등을 관찰하였다.

나) Somatic embryo 유도

새로운 유전자가 도입된 장미를 제조하기 위해서 가장 효율적인 방법으로 embryogenic callus를 유도하여 형질 전환하는 방법을 고안하였다. 우선 장미의 embryogenic callus를 유도하기 위해 먼저 petiole을 잘라서 MS salts, vitamine, 5mg/l의 2,4-D, 30g/l의 sucrose, 300mg/l의 L-proline과 4g/l의 agarose, pH 5.8로 구성된 preculture medium에 치상하여 28℃, 암실에서 유지하였다. 높은 농도의 auxin은 embryogenic callus의 형성을 유도하는데 사용하였다. 14일간 배양한 후 MS salts, vitamine, 3mg/l의 2,4-D, 30g/l의 sucrose, 300mg/l의 L-proline과 4g/l의 agarose, pH 5.8로 구성된 embryo proliferation medium에 치상하여 28℃, 암실에서 유지하였다. 28일 간격으로 계대 배양을 실시하였고 약 20일정도 경과한 후 callus를 유도하였다.

4) 유도된 장미의 somatic embryo에 *Agrobacterium*도입

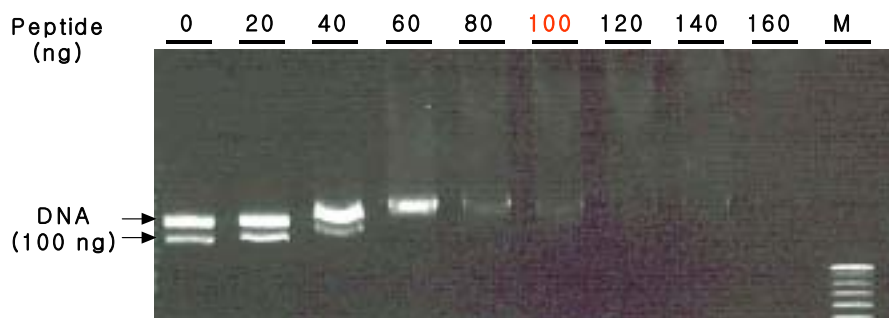
Embryogenic callus 형성이 가장 높은 심파스의 callus에 외래유전자를 갖고 있는 *Agrobacterium*과 3일간의 공조 배양 후 1/2MS salts, 0.4mg/l의 thiamine HCl, 6g/l의 myo-inositol, 30g/l의 sucrose, 0.3mg/l 2,4-D, 1mg/l BA, 4g/l agarose, pH 5.8로 구성된 culture medium에 200mg/l의 kanamycin과 500mg/l의 carbenicillin의 항생제를 포함한 선택배지에 치상하여 밝은 곳에서 배양한 후 shooting이 유도되는 것을 선택 배양하였다.

5) Synthetic peptide를 이용한 형질전환

실험에 사용된 peptide는 Arginine 12mer , RRRRRRRRRRRR, R12로 Peptron, INC에서 합성하였고, purity가 95%이상인 것을 사용하였다. Peptide stock은 269 μ M의 농도가 되도록 phosphate-buffered saline(PBS)에 녹인 후 적당량을 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

Peptide를 이용한 DNA delivery를 실험하기 위해 peptide와 DNA의 optimal binding concentration을 agarose gel retardation assay를 통해 확인하였다. Peptide와 DNA의 binding시 이들 간의 ratio는 penetration-effective complex를 형성하는데 매우 중요한 것으로 알려져 있다. Peptide와 DNA의 optimal binding concentration을 측정하기 위해 pBI121 plasmid 100ng과 각기 다른 양의 peptide를 ice위에서 1시간 binding하였고, 이를 1% agarose gel electrophoresis를 통해 분석하였다. DNA와의 binding에 요구되는 peptide의 양은 peptide와 DNA가 complex를 이루어 완벽하게 retardation될 때의 양으로 결정하였다.

35S promotor를 가진 SAMDC16을 coding하는 pBI121(13kb) plasmid가 peptide와의 interaction 실험에 사용되었다. 동량의 DNA(100ng)에 대해 넣어준 peptide의 양이 증가됨에 따라 DNA-only control에 비교하여 pBI121의 mobility에 retardation이 일어났고, 100ng의 peptide에 의해 complex가 형성된 후의 lane에서는 well에 남아 EtBr에 의해 staining 되는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 100ng의 peptide와 100ng의 DNA가 penetration-effective complex를 형성하는 ratio일 것으로 추측할 수 있게 해준다. 또한 100ng 이상의 peptide가 첨가된 경우 DNA가 surface로 노출되게 구조를 형성하여 EtBr에 의한 staining이 가능한 것으로 예상된다.



Peptide - DNA agarose gel retardation assay

그림 9. 100ng의 pBI121과 여러 가지 농도의 peptide를 PBS buffer에서 1시간 동안 complex를 형성하도록 방치한 후 gel상에서 관찰

장미 조직은 로즈유미를 사용하고 embryo callus는 심파스를 이용하였다. PBS 200 μ l에 DNA와 peptide를 각각 2 ng씩 첨가하여 ice에서 1시간 동안 complex를 형성하도록 incubation 하였다. 그리고 나서 각각 조직과 callus에 침투하도록 dark상태에서 25 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 shaking한 후 항생제가 포함되지 않은 MS배지에서 3일간 안정화시켰다. 3일 후 200mg/l의 kanamycin이 첨가된 MS배지에 치상하여 2주마다 계대배양 하면서 관찰하였다.

2. 제 2 세부과제

가. 형질전환 장미의 특성조사 및 실용화 기술개발

1) 형질전환용 장미 유전자원 특성조사 및 선발

세계적으로 3대 화종의 하나인 장미는 현재 20,000여종이 육성되어 있으며 국내에서도 재배면적과 생산액이 꾸준히 증가하고 있는 주요 절화류이다. 전라남도농업기술원에서는 장미 신품종을 육성하기 위해 유전자원을 표 3과 같이 1998년부터 2003년까지 수집종 포함 600여종을 수집하여 유전자원 품종포에 40×30cm, 2열(휴간 170, 휴폭 100cm)로 품종당 2주씩 식재되어 있다. 유전자원의 재배 및 관리 방법은 기존 재배법에 준하여 관리하였으며 동계에는 휴면시켜 수세가 회복되어 제 특성이 발현할수 있도록 유도하였다. 이 자원을 활용하여 314종에 대한 기본특성을 조사하였다. 또한 형질전환에 유리한 품종을 선발하기 위해 수집 유전자원을 특성을 조사하여 그 중 특성이 우수하다고 판단되어지는 품종 및 계통과 5월~6월경에 우수계통을 교배하여 결실된 종자를 순천대학에 형질전환용 장미시료로 전달하였다.

표 3. 유전자원 보유현황

연도별 유전자원 보유 (종)						비 고
계	'98	'99	'00	'01	'02-03	
600	400	80	50	20	50	절화, 정원, 분화,대목용 등

보유 유전자원에 대한 특성을 조사하기 위해 UPOV 조사기준 및 농사시험연구 조사기준(농촌진흥청 1995년)를 참고하여 주요하다고 판단되는 8개 항목을 314종에 대해 조사하였다. 표 4와 같이 식물체 화형, 화색, 초장, 꽃직경, 꽃잎수, 가지정도, 흰가루병 포장저항성 등을 3년동안 조사하였다.

표4. 유전자원별 특성별 조사기준

번호	특 성	표 현 형 태	계급	조사규격	조사기준 및 방법
1	식물체 : 초장(height)	작다	3	50cm이하	첫꽃 개화시 조사
		중간	5	51 ~ 70cm	
		크다	7	71cm이상	
2	꽃 : 직경	매우 작다	1	4.0cm이하	꽃이 3/4정도 개화했을 때 꽃의 가장 긴쪽의 직경
		작다	3	4.1~7.0cm	
		중간	5	7 . 1 ~	
		크다	7	10.0cm	
		매우 크다	9	1 0 . 1 ~ 12.0cm 12.1cm이상	
3	꽃 : 꽃잎수	매우 적다	1	10매이하	첫꽃이 완전히 개화하였을 때
		적다	3	11 ~ 20매	
		중간	5	21 ~ 30매	
		많다	7	31 ~ 40매	
		매우 많다	9	41매이상	
4	꽃 : 향기	없거나 매우 약하다	1		첫꽃이 3/4정도 개화했을 때의 향기 정도
		약하다	3		
		중간	5		
		강하다	7		
		매우 강하다	9		
5	긴가시(long prickles) : 수	없음	0	0개	개화시의 중간부분 10cm에 발생된 긴 가시수
		매우 적다	1	1개이하	
		적다	3	2~3개	
		중간	5	4~7개	
		많다	7	8~9개	
6	흰가루병 포장저항성	매우 많다	9	10개이상	포장에서 흰가루병 발생을 조사
		무발생	0	0%	
		피해가 거의 없음	1	1%이하	
		피해가 약간 있음	3	2~5%	
		피해가 많음	5	6~25%	
피해가 심한편임	7	26~50%			
피해가 아주심함	9	51%이상			

2) 품종별 장미 화질 및 신선도 유지에 대한 폴리아민의 영향

절화장미의 수확 후 절화수명과 품질에 미치는 요인들은 수확 후 요인뿐만 아니라 수확전의 요인들에 의해 상호 유기적인 영향을 미친다.

절화의 화질과 신선도에 폴리아민이 미치는 영향을 연구하기 위하여 주 재배품종으로 국내 재배 10대 품종인 카디날과 비탈을 100송이씩 수확하여 재료로 사용하였으며 재배방법 및 관리방법은 기존 재배법에 의해 재배 관리하였다.

폴리아민 처리방법은 1mM putrescine, spermidine, 및 spermine 등을 각각 절화에 처리한 후 8일간 배양하면서 신선도 유지와 화질 및 노화정도를 조사하였다.

4절. 연구수행 결과

1. 제 1 세부과제

가. SAMDC uORF의 활성 및 기능분석

1) SAMDC uORF의 단백질 합성 억제

가) SAMDC uORF 및 point mutation을 이용한 재조합 constructs 제조

uORF는 단백질 합성을 억제하는 조절인자로 알려져 있다. 그러나 이러한 uORF가 code 하고 있는 아미노산의 길이가 매우 짧아서 보통 10개 미만이며, 포유류에서 보고된 것도 15개 정도이다. 식물의 ADC 경우 7개의 아미노산으로 된 uORF가 존재하는 것으로 보고 되어 있다. 그러나 SAMDC의 uORF는 지금까지 보고된 uORF보다 아미노산의 길이가 길어 54개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 약 5.7kD의 단백질을 code하고 있다 (그림 10, A). 이러한 uORF가 단백질 합성을 억제하는 기작은 아직 정확하게 밝혀져 있지 않다. 따라서 SAMDC에 존재하는 uORF가 다른 것들과 비슷하게 단백질 합성을 억제할 수 있는지를 분석하는 것은 매우 중요하다.

이를 위하여 카네이션에서 분리된 SAMDC의 cDNA 중 5'-UTR에 54개의 아미노산으로 이루어진 uORF(*CSDC9*)를 reporter유전자인 *GUS* gene과 재조합하였다. 재조합 constructs는 pBluescript SK+ vector의 T3 promoter를 가지고 있으며, 4가지 종류를 만들었다. SAMDC uORF가 포함된 construct I, uORF의 start codon ATG를 TTG로 point mutation 시킨 construct II, uORF의 stop codon TGA를 AGA로 point mutation 시킨 construct III, 그리고 uORF의 start codon과 stop codon은 존재하는 상태에서 amino acid를 shift 시킨 construct IV이다.

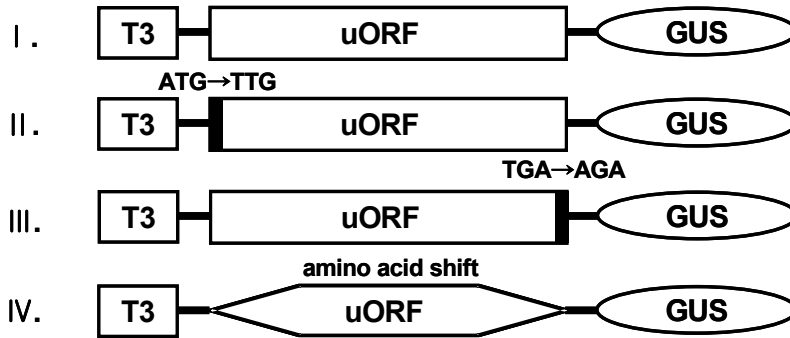
Construct I은 정상적인 SAMDC uORF sequence를 가지고 있어 정상적인 uORF peptide를 만든다. construct II는 start codon이 바뀌었고 SAMDC uORF 중간에 methionine을 code하기 않기 때문에 이론적으로 uORF sequence 부분이 code하는 peptide도 만들어지지 않는다. Construct III는 uORF의 stop codon이 없어졌기 때문에 GUS와 uORF fusion protein이 합성될 것으로 추정된다. 그리고 construct IV의 경우는 uORF에 의하여 code하는 peptide의 아미노산 조성이 기존 uORF와 다를 것으

로 판단된다. 이러한 각각의 construct들은 T3 primer와 T7 primer를 이용하여 염기 서열분석을 의뢰한 결과 재조합 여부를 확인하였다 (그림 10).

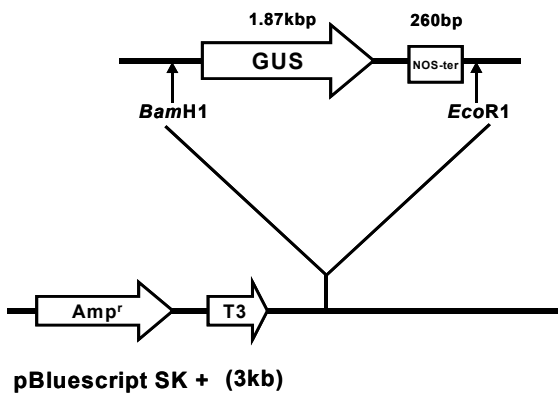
(A)

MESKGGKKKSSSSSSSSTKSFFAPLGYSEDLRPKGGIKKFRSAAYSNCARKPS

(B)



(C)



(D)

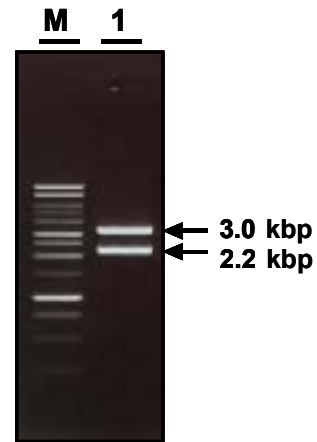


그림 10. *CSDC9* uORF 및 point mutation을 이용한 재조합 constructs 모식도

(A) *CSDC9* uORF의 아미노산 서열, (B) point-mutated constructs 모식도, (C) 재조합 construct 구조, (D) 제한효소로 절단한 전기영동 사진 - M; DNA size marker, lane 1; T3:△uORF-GUS

나) *In vitro* transcription/translation (TNT) 반응을 이용한 GUS 활성 변화에 미치는 uORF의 영향

uORF가 downstream에 있는 main ORF의 translation을 억제하는지를 확인하기 위하여 상기에서 언급한 uORF의 여러 가지 형태의 재조합 constructs를 이용하여 *in vitro* transcription/translation (TNT) 반응 후에 GUS activity를 측정하였다. 그 결과 정상적인 uORF가 포함된 construct I과 uORF가 제거된 construct II의 GUS activity는 각각 41.7 pmol/μl/h과 2195.9 pmol/μl/h로 construct I의 경우 약 50배 정도 높았다. uORF의 start codon ATG를 TTG로 바꾼 construct III, uORF의 stop codon TGA를 AGA로 바꾼 construct IV에서는 각각 705.0 pmol/μl/h와 541.7 pmol/μl/h의 GUS activity를 나타내었다. 그러나 uORF의 start codon과 stop codon은 그대로 존재한 상태에서 아미노산의 서열만 바꾸어준 construct V의 경우는 37.4 pmol/μl/h로 construct I과 비슷한 활성을 나타내었다 (그림 11).

이러한 결과는 uORF가 GUS의 활성을 억제하는 것을 나타낸다. 한편, uORF는 자신의 downstream에 존재하는 main ORF의 합성을 억제할 뿐 만 아니라 합성된 uORF가 trans로 다른 단백질의 합성을 억제하는 것이 알려져 있다. 이를 확인하기 위하여 위의 construct I과 construct II를 혼합하여 *in vitro* TNT를 실시하였다.

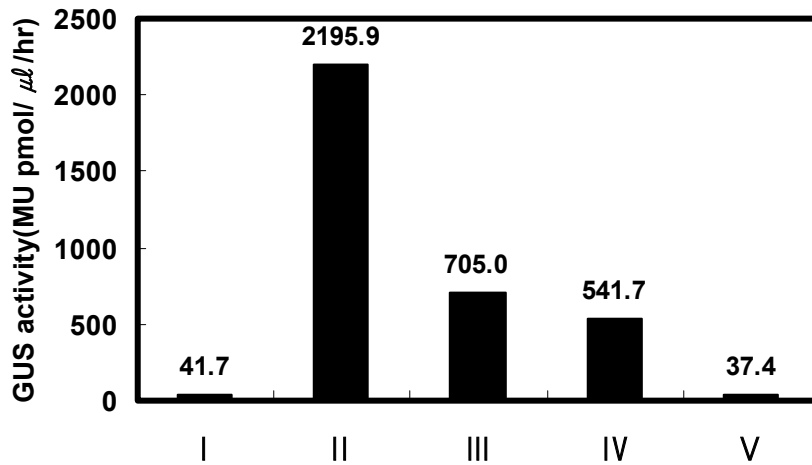
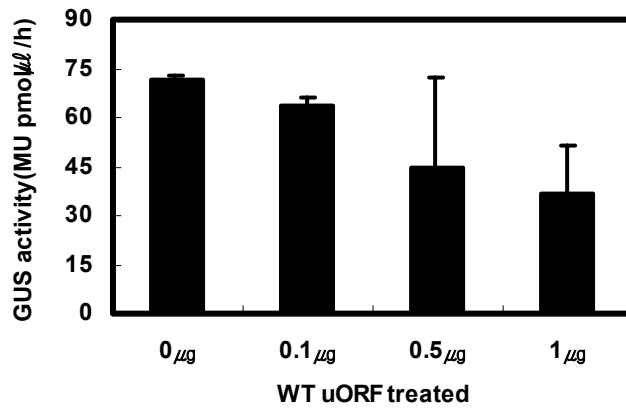


그림 11. Point-mutated constructs를 이용한 *in vitro* transcription/translation (TNT) 반응 후의 GUS 활성 변화

TNT reaction의 경우 초기 반응조건에 민감하게 영향을 받는 것으로 알려져 있기 때문에 construct I에 동일한 construct를 DNA를 $0.1\mu\text{g}$, $0.5\mu\text{g}$, $1\mu\text{g}$ 첨가하여 GUS activity를 측정하였다. 정상적인 uORF가 포함된 construct I의 TNT반응에서는 각각 약 10%, 40%, 50% 정도로 GUS activity가 억제되었다 (그림 12, A). 이것은 TNT 반응용액에 첨가된 DNA 양이 전체 TNT 반응에 주는 영향이 우리가 사용한 실험 조건에서 약 50%이내임을 의미한다. 그리고 uORF가 제거된 construct II에 construct I을 상기와 동일한 양으로 첨가한 경우 $0.1\mu\text{g}$ 만 첨가해도 GUS activity가 약 80% 정도로 크게 낮아지는 것을 확인할 수 있었다 (그림 12, B). 이는 정상적인 uORF를 포함하고 있는 construct I이 construct II에 의한 GUS 합성을 억제할 수 있다는 것을 의미한다.

(A)



(B)

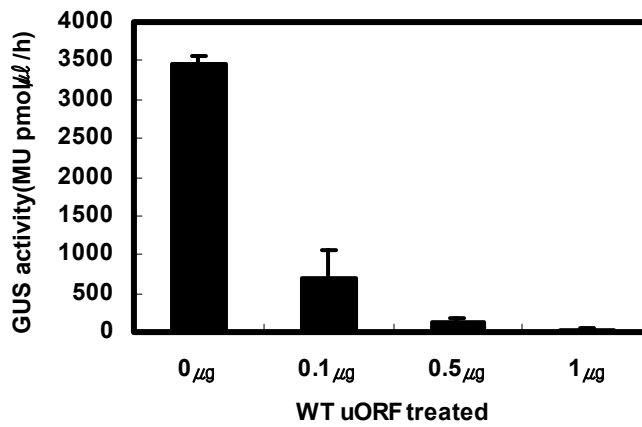


그림 12. TNT 반응에서 Construct I (A) 과 construct II (B)에 의해 합성되는 GUS 유전자에서 WT uORF의 영향

uORF를 여러 가지 형태로 재조합 시킨 constructs를 이용한 TNT 반응 후 합성되는 단백질을 조사하기 위하여 ³⁵[S]-methionine을 이용한 autoradiography 분석을 실시하였다. 반응 생성물을 15% SDS-PAGE (PeptiGel) 전기영동하여 그림 13의 결과

를 얻었다. 세 가지 construct (I, II, III)를 이용한 경우 모두 GUS의 크기에서 짙은 밴드를 확인하였고, construct I에서만 uORF protein의 발견되었다. uORF protein은 순수 분리한 uORF protein을 동시에 loading 하여 5.7kDa의 크기를 확인하였다.

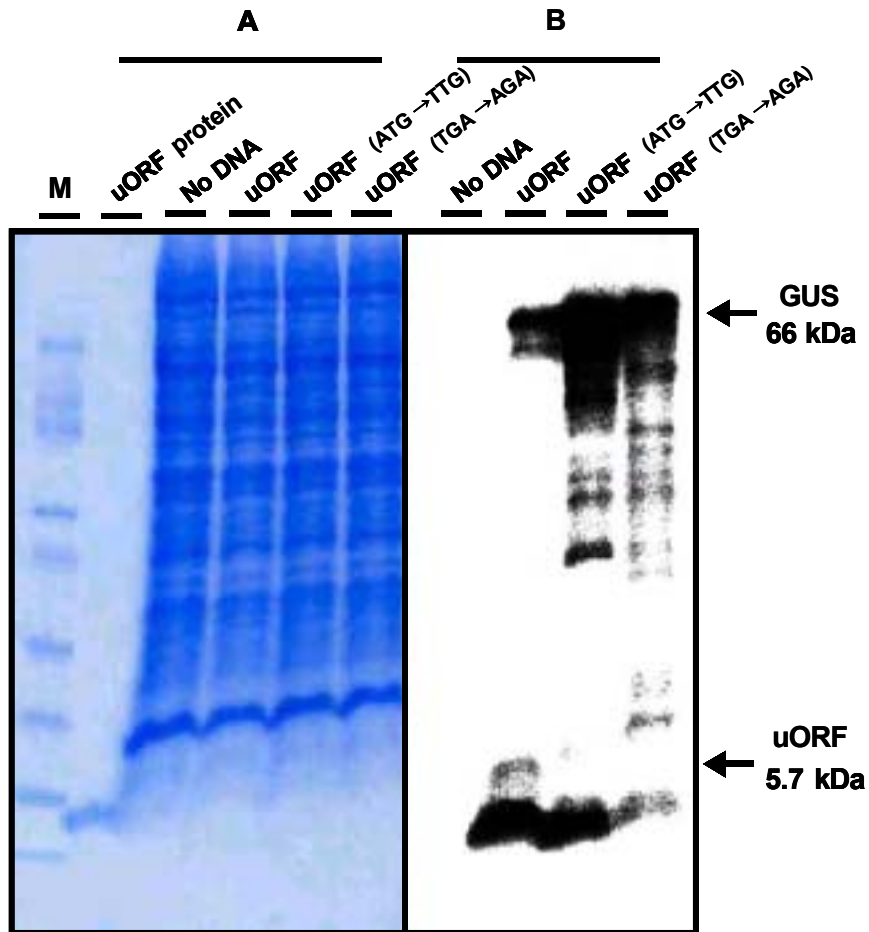


그림 13. ³⁵[S]-methionine을 이용한 *in vitro* transcription/translation (TNT) 반응 후의 SDS-PAGE analysis와 autoradiography

(A) 15% SDS-PAGE (PeptiGel) analysis 후 coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색한 사진

(B) ³⁵[S]-methionine을 이용한 autoradiography

다) SAMDC uORF를 포함한 5'-UTR의 영향

현재 *in vitro* 상에서 이루어지는 실험들은 164bp의 SAMDC uORF가 pBluescript SK⁺ vector의 T3 promotor의 조절을 받아 GUS reporter gene과 재조합된 것이다. 그러나 uORF 뿐만 아니라 uORF를 포함한 *CSDC9*의 5'-UTR 역시 그 역할이 중요시 되면서 5'-UTR이 포함된 construct를 제조하기로 결정하였다. 먼저 이미 제조된 T3: ΔuORF-GUS construct를 *Bam*H1과 *Sac*II enzyme으로 절단해서 약 5.2Kbp의 band를 분리하였으며 PCR을 통해 증폭시킨 5'-UTR은 gene clean을 통해 약 450bp의 band로 분리하였다. 이 후 ligation을 통해 재조합 construct를 완성하였다 (그림 14).

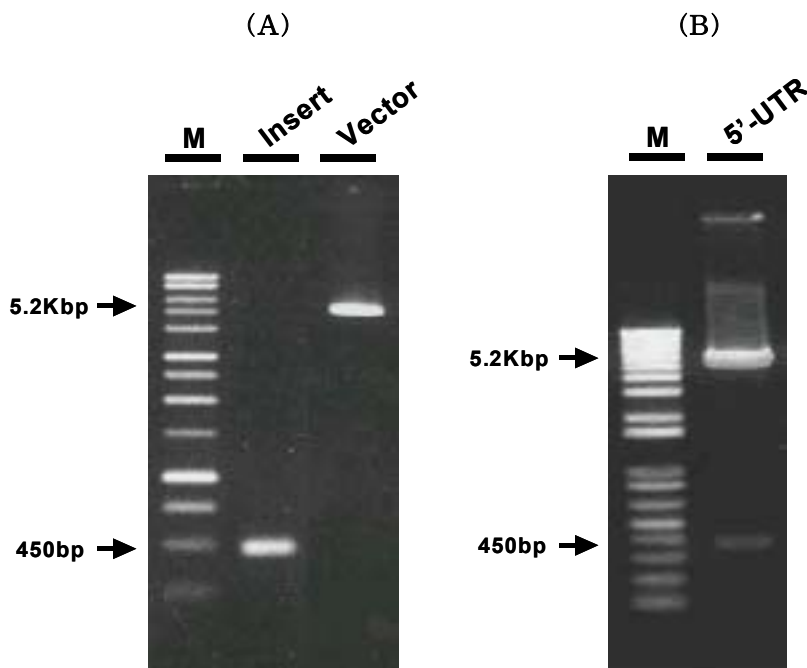


그림 14. *CSDC9*의 5'-UTR construct 제조 전(A) 후(B)의 전기영동 사진

위와 같이 재조합된 5'-UTR construct는 WT uORF, ΔuORF construct와 함께 *in vitro* TNT반응을 실시하여 GUS activity를 측정하였다. 그 결과 5'-UTR construct에서는 uORF가 존재함에도 불구하고 downstream GUS activity가 높게 측정되었으며 특히 uORF가 존재하지 않는 ΔuORF construct와 비슷한 효과를 나타내

었다. 따라서 이러한 결과는 5'-UTR 내에 특정한 internal initiation site가 존재할 가능성을 시사하며 translation inhibitor로 작용하는 uORF의 기능을 적절히 조절하는 것으로 여겨진다 (그림 15).

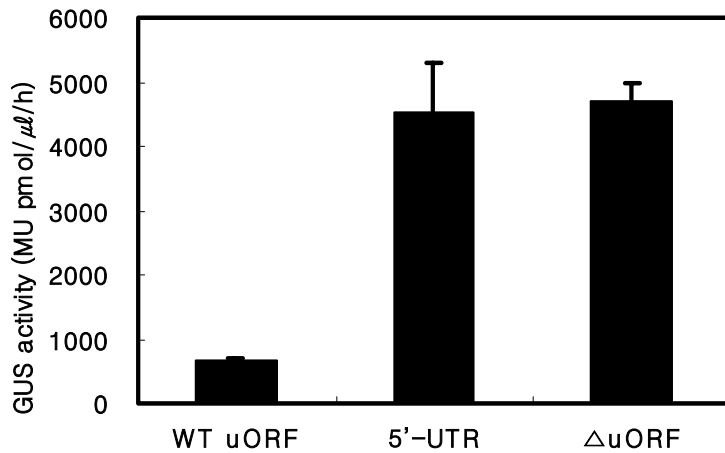


그림 15. 5'-UTR construct를 이용한 *in vitro* transcription/translation (TNT) 반응 후의 GUS 활성 변화

3) uORF에 의한 mRNA의 steady-state level 조절

이상의 실험 결과는 uORF가 GUS 유전자의 발현을 억제할 수 있음을 나타내고 있다. 그러나 이러한 억제가 transcription에서 일어나는 것인지 translation에 의해서 일어나는 것인지는 명확하지 않다. 따라서 상기의 construct를 이용하여 *in vitro* TNT 반응을 실시한 후 *GUS*의 steady-state level을 조사하기 위하여 northern blot analysis를 실시하였다. 상기에서 사용한 constructs를 이용하여 *in vitro* transcription 반응을 수행한 후에 반응 산물에서 total RNA를 추출하였고, *GUS* 유전자를 probe로 사용하여 northern blot analysis를 수행하였다. 그 결과 uORF가 제거된 것 (lane 2), uORF의 start codon ATG를 TTG로 바꾼 것 (lane 3), uORF의 stop codon TGA를 AGA로 바꾼 것 (lane 4)에서는 *GUS* mRNA 양이 강하게 나타났으며 대조적으로 정상적인 uORF를 가진 것 (lane 1)과 uORF의 아미노산 서열을 frame shift 시킨 것

(lane 5)에서는 약하게 나타났다. 이러한 transcripts의 양적 변화를 분석해 본 결과 uORF가 없는 construct에서 약 4배 정도의 증가를 확인하였다. 이것은 그림 11에 나타난 GUS의 활성 50배 증가를 설명하는데 충분하지 않다. 따라서 uORF는 transcription 뿐만 아니라 translation을 억제하는 것으로 판단되며 GUS mRNA 수준의 미치는 uORF의 영향은 transcription의 속도 혹은 mRNA stability의 차이에서 기인했을 것으로 생각된다 (그림 16).

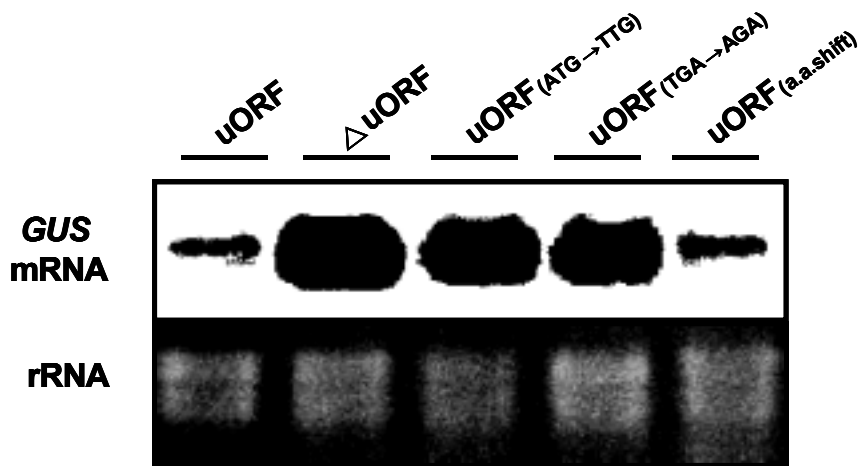


그림 16. Northern blot analysis를 이용한 GUS mRNA의 변화 패턴

따라서 TNT 반응 과정 및 uORF가 mRNA stability에 영향을 주는지 확인하기 위하여 constructs 중에서 정상적인 uORF를 가진 construct와 uORF가 제거된 construct를 사용하여 *in vitro* TNT 반응액 내에서 RNA degradation 비율을 측정해보았다. 먼저 *in vitro* transcription 반응 후, DNA와 결합하여 RNA polymerase에 의한 DNA의 전사를 방해하는 항생물질인, actinomycin D를 $40\text{ng}/\mu\ell$ 의 농도로 반응액에 첨가하였다. 반응이 끝난 직후 actinomycin D를 첨가하고, 즉시 total RNA를 추출한 것(T_0 , 0분)과 시간이 경과함에 따라 T_5 (5분), T_{10} (10분), T_{30} (30분), T_{60} (60분)으로 반응산물에서 total RNA를 추출하였다. 이렇게 추출된 RNA $0.8\mu\text{g}$ 을 RNA 전기영동을 실시하였고 [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$] dCTP의 동위원소를 사용하여 northern blot analysis를 수행하였다. 그 결과 정상적인 uORF를 가진 construct보다는 uORF가 제거된 construct에서 전체적으로 RNA가 강하게 발현되었으며 시간이 경과함에 따라서 RNA가 감소하

는 경향이 관찰되었다. 또한 [α - 32 P] dCTP의 동위원소로 label된 membrane은 X-ray 필름에 감광된 band와 크기를 비교하여 그 부위만을 cutting 한 후에 vial에 옮겼고 여기에 cocktail solution을 첨가하여 liquid scintillation counter로 방사능을 측정하였다. 이때 각각의 T₀ (0분)의 값을 100%로 놓고 나머지 값들을 %로 환산하여 그래프로 나타내었다. 그 결과 두 constructs에서 mRNA 감소에 뚜렷한 차이가 없었다 (그림 17). 이러한 결과는 상기 그림 16에서 나타난 transcripts의 양적 차이가 분해가 아니라 합성에 의하여 나타나는 것을 의미한다.

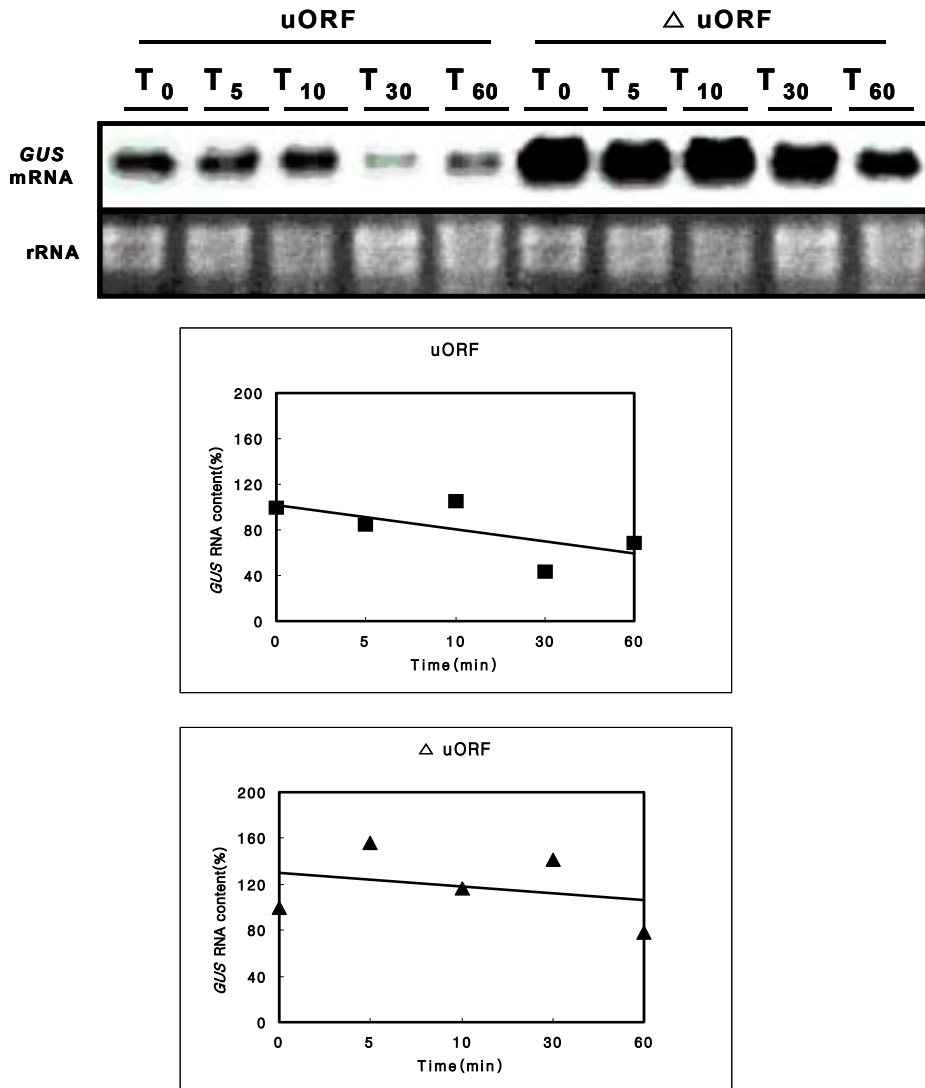


그림 17. Northern blot analysis를 이용한 mRNA stability 비교

이와 같이 uORF가 mRNA 합성에 영향을 줄 수 있다는 TNT 결과를 통해서 이러한 현상이 *in vivo*에서도 일어날 수 있는지를 확인하였다. 이를 위하여 construct I과 II가 각각 형질전환 담배 식물체 seedling으로부터 핵을 추출하여 nuclear run-on transcription assay를 수행하였다. 이때 5 μ g의 *GUS* 유전자를 membrane에 붙여 dot blotting을 수행하였으며, 그 결과는 그림 18에 나타내었다. *GUS* 유전자를 probe로 사용한 northern blot analysis 결과와 같이 정상적인 uORF를 가진 형질전환 담배 식물체에서 *GUS* 유전자의 transcription 속도가 가장 낮았다. 그리고 uORF의 start codon ATG를 TTG로 바꾼 형질전환 담배 식물체에서는 uORF가 없는 것과 비슷하게 transcription이 증가하였음을 확인할 수 있었다. 따라서 uORF가 downstream *GUS* 유전자의 transcription 단계에 영향을 미쳐 transcription 속도를 감소시키는 것으로 추정된다. 그러나 이때 uORF 단독으로 작용하는 것인지 아니면 여러 가지 transcription factor들과 상호 작용하는 것인지는 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

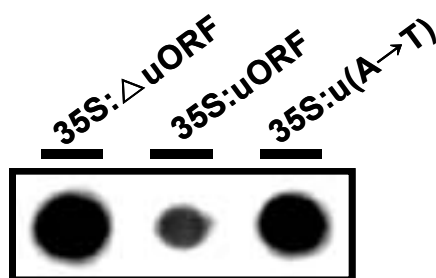


그림 18. Nuclear run-on transcription assays.

4) 폴리아민에 의한 feedback inhibition 조절 효과

SAMDC 효소의 최종산물인 폴리아민이 uORF의 작용에 미치는 영향을 알아보기 위해서 T3 promoter에 uORF와 *GUS* gene이 재조합된 construct의 TNT 반응과정에 다양한 농도의 폴리아민을 처리하였다. Put, Spd, Spm을 각각 0.001mM, 0.01mM, 0.1mM, 1mM, 10mM의 농도로 첨가하여, *in vitro* TNT반응 후에 *GUS* activity를 측

정한 결과 Put, Spd, Spm 모두 농도별로 GUS activity의 차이는 크게 나타나지 않았고, 대체적으로 1mM 농도에서 미미하지만 GUS activity가 감소하는 경향을 보였다 (그림 19).

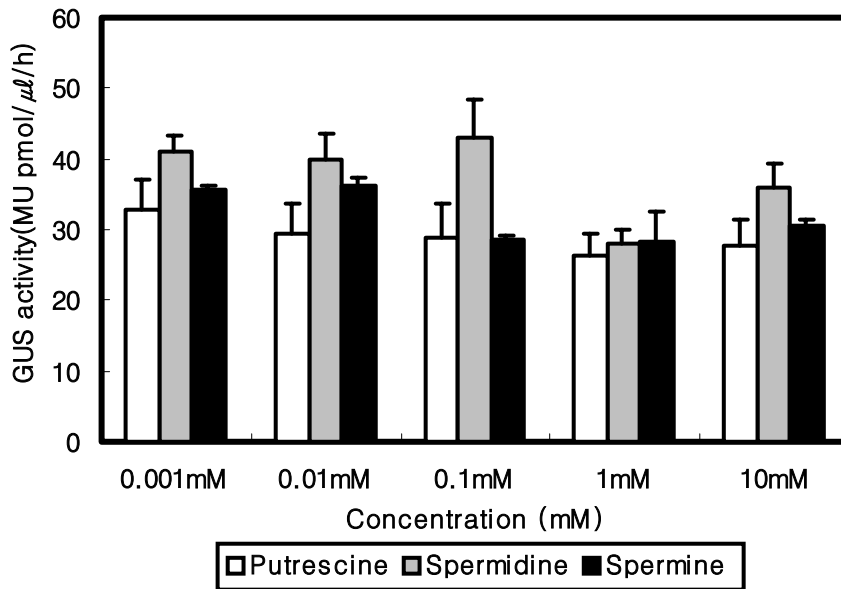


그림 19. GUS 활성화에 미치는 폴리아민의 농도별 영향

T3 promoter에 uORF와 GUS gene이 재조합된 construct와 uORF의 개시코돈 ATG를 TTG로 point mutation시킨 construct를 가지고 ³⁵[S]-methionine을 이용하여 *in vitro* transcription/translation (TNT) 반응을 수행하였다. 반응산물은 15% SDS-PAGE 전기영동 후 autoradiography를 실시하여 66kDa의 GUS protein과 5.7kDa의 uORF peptide를 확인하였다. Point mutation시킨 construct의 경우 정상적인 uORF를 가지는 construct보다 합성된 polypeptide의 양이 많이 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 각각의 construct에 1mM의 농도로 putrescine, spermidine, spermine을 처리하여 TNT반응을 수행한 결과 putrescine을 처리한 것에서는 protein의 양이 거의 변화가 없었으나 spermidine과 spermine을 처리한 것에서는 protein의 양이 급격하게 감소한 것을 확인할 수 있었다 (그림 20).

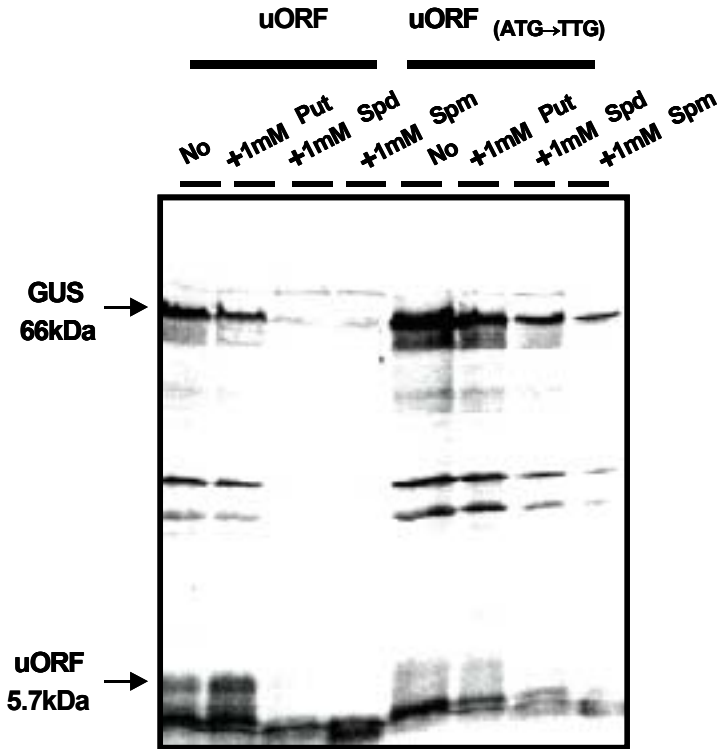


그림 20. 폴리아민 처리 후 35 [S]-methionine을 이용한 autoradiography

5) SAMDC uORF-GFP protein의 subcellular localization

그림 16, 17, 그리고 18의 결과는 SAMDC uORF가 translation 뿐만 아니라 transcription을 억제할 수 있음을 보여주고 있다. 그런데, TNT 실험으로는 uORF가 단백질로 만들어진 후 transcription에 영향을 줄 수 있는지를 파악하는 것은 매우 어렵다. 따라서 uORF peptide가 핵으로 들어갈 수 있는지를 분석하고자 하였다. 이를 위하여 green fluorescent protein (GFP) fusion construct를 제조하여 subcellular localization을 확인하였다. GFP가 35S promoter에 의해 조절되는 pMBP-1 vector의 multiple cloning site 중에서 *Xba*1 과 *Bam*H1 site에 PCR 반응으로 합성된 uORF 유전자를 재조합 시켰다. 제한효소 *Xba*1 과 *Bam*H1으로 digestion해서 1% agarose 전기영동을 통해 270bp의 band를 확인하였으며, 최종적으로 염기서열분석을 의뢰하여 재조합 여부를 확인하였다 (그림 21, 22).

(A)

Sense primer

5' -GGGTCTAGACTCTGATATTCGTTTCAACA- 3'

Antisense primer

5' -GGGGATCCGGACGGTTTTACAACAATAT- 3'

(B)

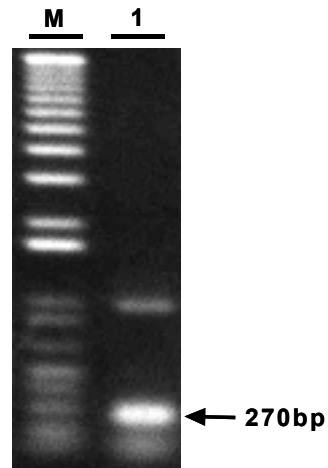
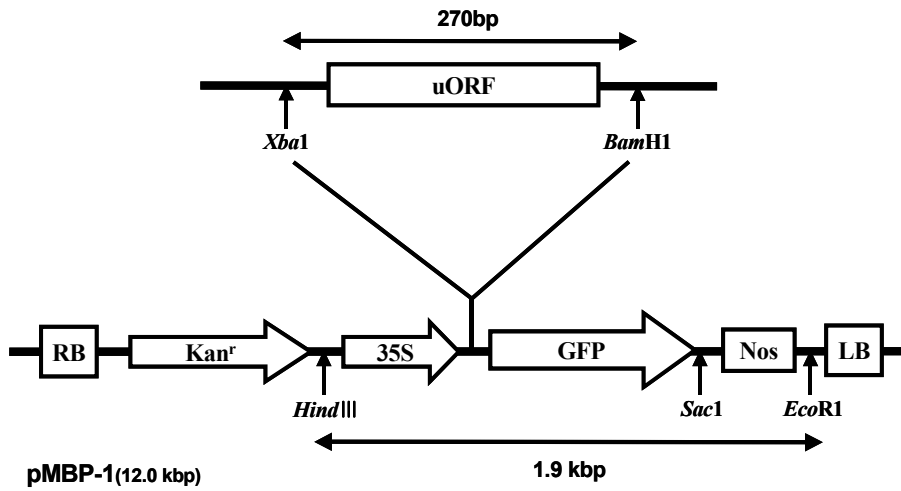


그림 21. 35S:uORF-GFP construct 제조를 위한 PCR products

(A) uORF(TGA→AGA) construct로부터 증폭시킨 PCR primer sequence

(B) PCR agarose gel 사진 (M: DNA size marker ; lane 1: uORF PCR product).

(A)



(B)

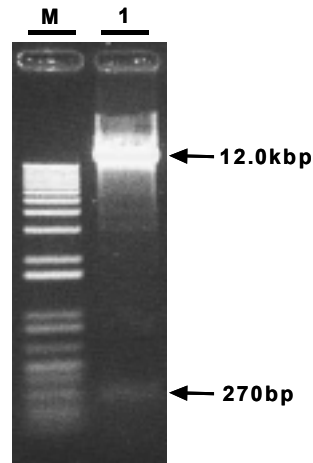


그림 22. 35S:uORF-GFP construct 모식도

(A) 재조합 construct 제조과정

(B) 제한효소로 절단한 재조합 construct agarose gel 사진

이와 같이 만들어진 *uORF-GFP* construct는, 2-3주된 *Arabidopsis* seedlings으로부터 protoplasts를 분리해서 polyethylene glycol (PEG) 처리에 의한 transient

expression assay 방법으로 transformation 시켰다. 한국생명공학원에서 confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss LSM510)를 이용하여 형광 signal을 관찰하였다. 그림 23은 incubation 약 42시간 후에 green fluorescent signal이 세포질에서 선명하게 관찰되는 것을 나타내고 있다. 이것은 plant SAMDC uORF가 세포질에 존재한다는 것을 처음 밝히는 결과라고 생각된다. 그러나 uORF가 핵으로 이동하지 않을 가능성을 암시하기 때문에, uORF peptide가 직접 transcription을 억제할 가능성은 희박한 것으로 판단된다.

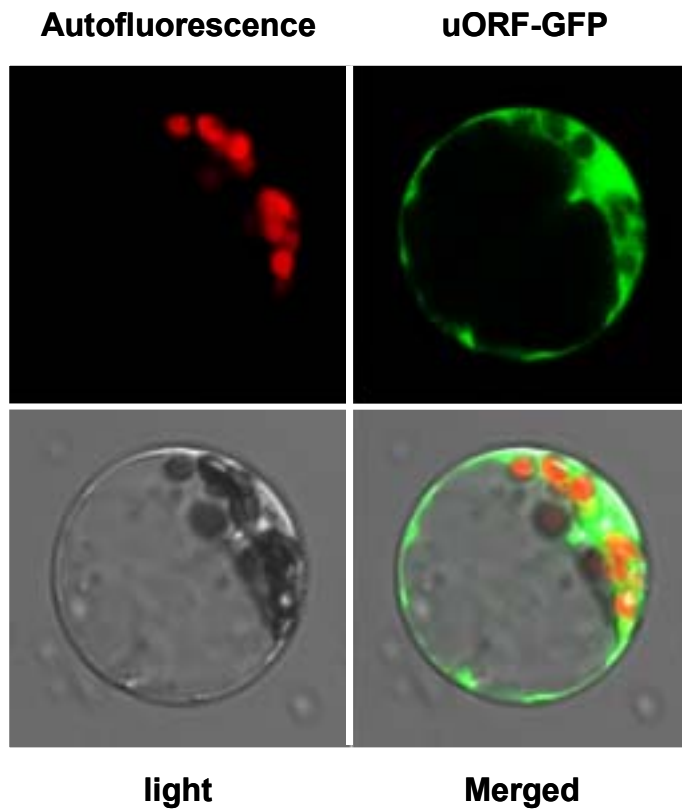


그림 23. *Arabidopsis* protoplasts에서 uORF-GFP 세포내 localization

6) SAMDC uORF protein의 phosphorylation

가) SAMDC uORF protein의 amino acid 구조분석

Predictprotein 프로그램을 이용하여 uORF protein의 구조를 분석한 결과 putative한 phosphorylation site가 4개 존재하였고, 총 54개의 아미노산 중에서 10번, 54번 serine이 cAMP and cGMP-dependent protein kinase, 17번 serine이 protein kinase C, 28번 serine이 casein kinase 2 phosphorylation site로 분석되었다. 이러한 분석 결과는 uORF의 세포내 작용이 phosphorylation에 의해 활성이나 분해가 조절될 가능성을 암시한다. 따라서 이들 부위를 point-mutation시켜 *in vitro* TNT반응으로 GUS activity를 측정하였다. 그림 24는 phosphorylation 될 가능성이 있는 아미노산을 alanine으로 바꾼 후 *in vitro* TNT에 의한 GUS 활성변화의 상대적 비율을 나타낸 것이다. 10, 28, 54번째 serine을 alanine으로 바꾼 construct에서 WT uORF를 control로 실험한 것에 비해 GUS activity가 다소 억제되었으며 특히 10번 serine을 alanine으로 바꾼 construct에서는 GUS activity가 2배 이상 억제되었다. 또한 17번째 serine을 alanine으로 바꾼 construct에서는 control 보다 조금 높게 GUS activity가 측정되었다. 따라서 uORF protein의 54개의 아미노산 중 10번 serine의 역할이 중요할 것으로 사료된다.

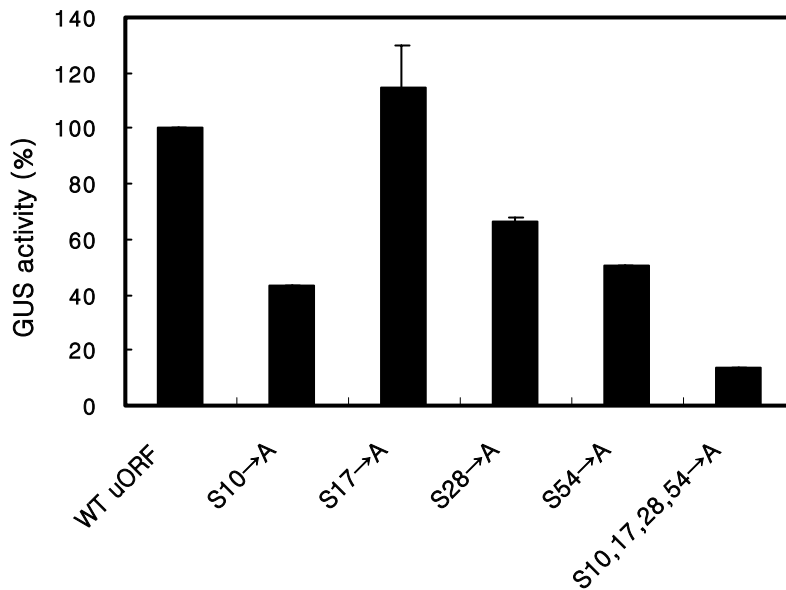


그림 24. Point-mutated constructs를 이용한 *in vitro* transcription/translation (TNT) 반응 후의 GUS activity 측정

이러한 실험 결과는 phosphorylation이 uORF의 기능에 영향을 줄 수 있다는 것을 의미한다. 따라서 SAMDC uORF에 의해서 만들어지는 peptides가 phosphorylation 되는지를 확인하였다. 이를 위해서 카네이션 잎 추출물과 uORF protein을 [γ - 32 P]ATP (3000Ci/mmol)와 함께 반응시키는 *in vitro* phosphorylation assay를 수행하였다. 반응 산물은 15% SDS-PAGE (PeptiGel) gel electrophoresis 후 autoradiography를 통해서 phosphorylation 여부를 확인하였다. 그림 25(B)에 나타난 바와 같이 5.7kDa의 phosphorylated uORF protein이 phosphorylation 된다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 phosphorylated uORF protein 중에서도 어떠한 아미노산에 phosphorylation이 일어나는지와 어떤 종류의 kinase가 이 phosphorylation에 관여하는지에 대한 연구가 좀 더 진행되어야 할 것이다.

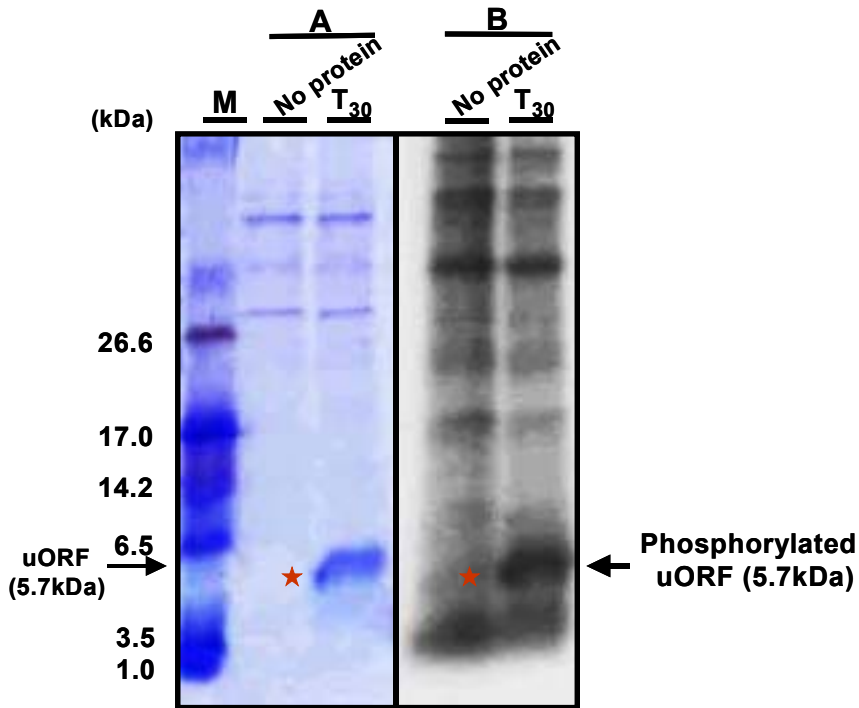


그림 25. SAMDC uORF의 *in vitro* phosphorylation assay

(A) Coomassie Brilliant Blue R-250 염색 사진

(B) [γ - 32 P]ATP를 이용한 autoradiograph

나) Point-mutation을 이용한 phosphorylation site 확인

카네이션 추출물에 의하여 uORF protein이 phosphorylation 되었기 때문에 어떠한 serine site에서 phosphorylation이 일어났는지는 세포내 uORF 활성조절에 매우 중요할 것으로 판단된다. 이를 정확하게 분석하기 위하여 serine을 alanine으로 치환한 mutnat 조합을 이용하는 방법을 사용하였다. 먼저 serine 10번, 17번, 28번을 alanine으로 point-mutation시킨 것 (P I), serine 10번, 17번, 54번을 alanine으로 point-mutation시킨 것 (P II), serine 17번, 28번, 54번을 alanine으로 point-mutation시킨 것 (P III), serine 10번, 17번, 28번, 54번을 alanine으로 point-mutation시킨 것 (P IV)을 expression vector인 pET-28a의 *Nde*1과 *Xho*1 site에 재조합시켰다. 이때 사용

한 PCR template는 각각 pBluescript SK vector에 이미 cloning된 것을 사용하였다. 그리고 제한효소 *Nde*I과 *Xho*I으로 digestion해서 1% agarose 전기영동을 통해 P I, P II, P III, P IV의 재조합 여부를 확인하였다 (그림 26). 재조합된 P III와 P IV constructs는 protein으로 정제하여 정제된 P III와 P IV construct에서 만들어진 단백질을 정제한 후 그림 25에서 사용한 동일한 방법으로 *in vitro* phosphorylation assay를 수행하였다.

(A)

Sense primer

5' -GGGCATATGGAATCAAAGGGTGGTAA- 3'

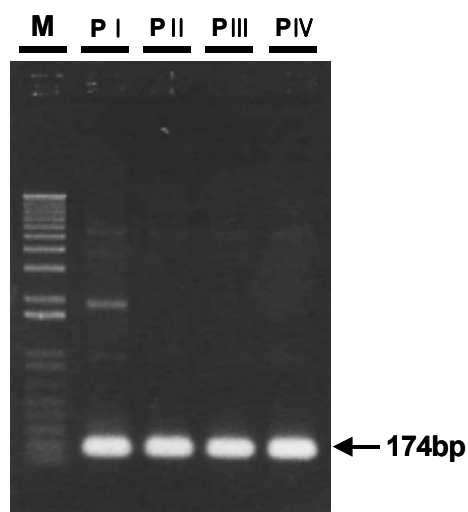
Antisense 1 primer

5' -GGGCTCGAGTCAAGACGGCTTGCGAG- 3'

Antisense 2 primer

5' -GGGCTCGAGTCAAGCCGGCTTGCGAG- 3'

(B)



(C)

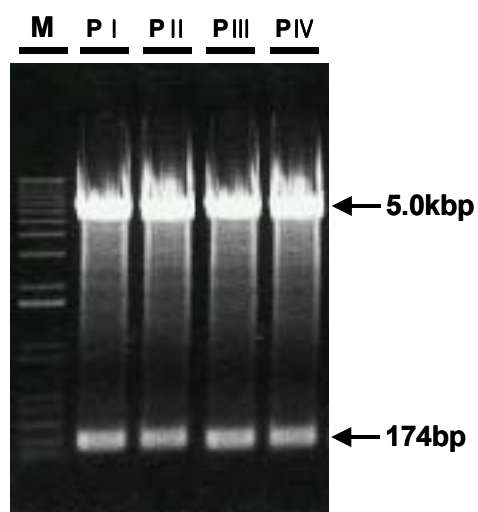


그림 26. Serine phosphorylation site를 alanine으로 바꾼 재조합 constructs

- (A) P I , P II , P III , P IV constructs를 증폭시키기 위해 필요한 PCR primer
 (B) PCR 후 agarose gel 사진 (M: DNA size marker ; P I : S10, S17, S28→A ; P II : S10, S17, S54→A ; P III : S17, S28, S54→A ; P IV : S10, S17, S28, S54→A).
 (C) 제한효소로 절단한 재조합 construct agarose gel 사진 (P I , P II , P III , P IV).

그림 27과 같이 serine 17번, 28번, 54번을 alanine으로 point-mutation시킨 P III를 이용한 결과에서 serine 10번 위치의 phosphorylation이 중요하다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 P I 과 P II constructs가 아직 완성되지 않았기 때문에 P I 과 P II constructs가 완성된 후에 자세한 분석이 필요한 것으로 판단된다. 그럼에도 불구하고 serine 10번, 17번, 28번, 54번을 alanine으로 point-mutation시킨 P IV를 이용한 결과에서 약하게 phosphorylation이 일어난 것은 serine 10번, 17번, 28번, 54번을 제외한 다른 serine부위와 threonine 또는 tyrosine 부위에서 phosphorylation이 일어날 가능성을 배제할 수 없다.

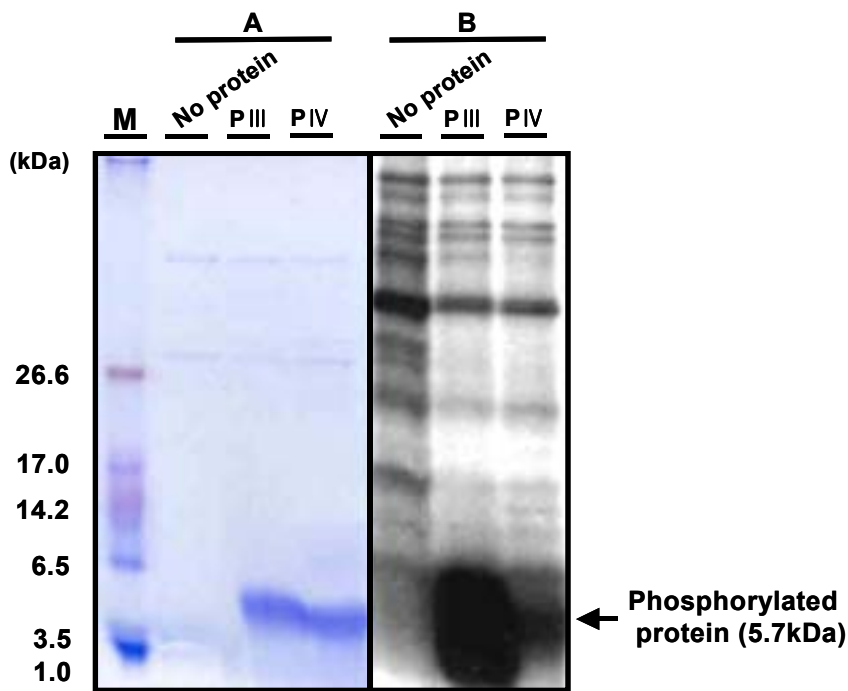


그림 27. P III and P IV protein의 *in vitro* phosphorylation assay

PIII: S17, S28, S54→A ; PIV: S10, S17, S28, S54→A.

(A) Coomassie Brilliant Blue R-250 염색 사진

(B) [γ - 32 P]ATP를 이용한 autoradiograph

7) SAMDC uORF의 작용기작 분석

가) SAMDC uORF에 의한 ribosome stalling

uORF가 존재할 경우 두 개의 ORF에서 어떠한 방식으로 translation initiation이 일어나는가에 대한 두 가지 가설이 알려져 있다. 하나는 reinitiation model로 uORF에서 translation 시작이 일어나 ribosome이 uORF peptide를 만든 후 40S ribosome이 계속 mRNA위를 진행하다가 새로운 AUG codon에서 다시 translation을 시작하는 모델이다. 다른 하나는 leaky scanning model로서 ribosome이 mRNA위를 translation 시작점을 찾기 위해서 scan할 때 uORF의 AUG codon에서 일정 확률로 translation 시작하지 않고 진행하여 두 번째 ORF에서 translation을 시작하는 것이다. 이러한 두 모델을 차이점은 toeprint를 이용하여 분석할 수 있는데, toeprint는 ribosome이 어느 위치에서 stalling 되는지를 확인하는 방법으로 많이 사용된다. *Xho*1으로 linearized시킨 template DNA를 capping 시켜서 *in vitro* transcription을 통해 mRNA를 추출하였으며, translation extracts의 primer extension을 위해서 reverse transcriptase를 사용하였다. 실험에 사용한 primer와 mRNA template는 그림 28과 같다.

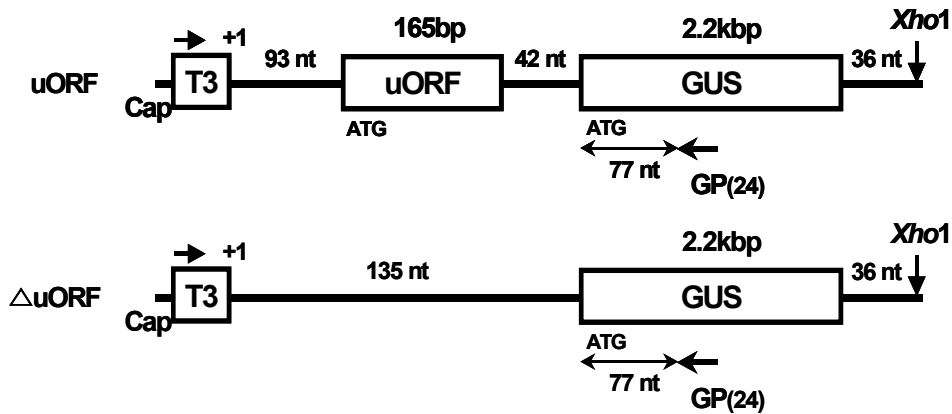


그림 28. Toeprint 실험에 사용한 mRNA templates의 모식도

두 가지 가설 중 어느 것인지를 증명하기 위해서 translation chemical inhibitor로서 60S ribosome 소단위체의 펩티딜전이효소의 활성을 저해시키는 cycloheximide를 처리하였다. 이 물질은 transcription elongation만을 억제하는 물질이다. 따라서 이 물질 처리한 후에도 initiation은 일어나며 translation이 시작된 지점에서 ribosome은 stall된다. 상기 두 가설 중 전자의 경우는 T0에서 이미 만들어진 ribosome complex가 uORF를 따라 elongation과정을 거치기 때문에 cycloheximide 처리에 의하여 두 번째 ORF인 GUS의 translation을 위한 AUG까지 올수 없다. 따라서 GUS를 위한 starting codon 근처에서는 ribosome stall이 T0 일어나지 않는다. 그러나 후자의 경우 cycloheximide가 initiation을 방해하지 않기 때문에 직접 두 번째 ORF인 GUS에서 translation initiation을 할 수 있다. 그러므로 두 번째 가설의 경우 GUS의 starting codon에서 ribosome stall이 발견할 수 있다.

Sequencing gel (8% acrylamide/7M urea)을 통해서 확인한 결과 정상적인 uORF를 가진 constructs를 가진 것과 uORF가 deletion 된 것 모두에서 T0에서 GUS protein의 translation과 관련된 stalling을 발견할 수 있었다. 그림 29는 T₁₀과 T₂₀에서 전반적으로 강하게 stall된 ribosome을 나타내고 있다. 특히 stall된 band는 downstream ORF의 start site 근처와 uORF의 termination site 부근에서 강하게 검출되었다. 그리고 uORF가 제거된 constructs에서는 T₂₀과 C₁₀에서 부분적으로 비슷하게 stall된 ribosome을 확인할 수 있었고, 이것을 통해 ribosome이 GUS protein의 translation이 개시되는 부분이라는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 uORF가 있는 유전자의 translation 시작이 leaky scanning에 의해서 이루어지고 있음을 의미한다.

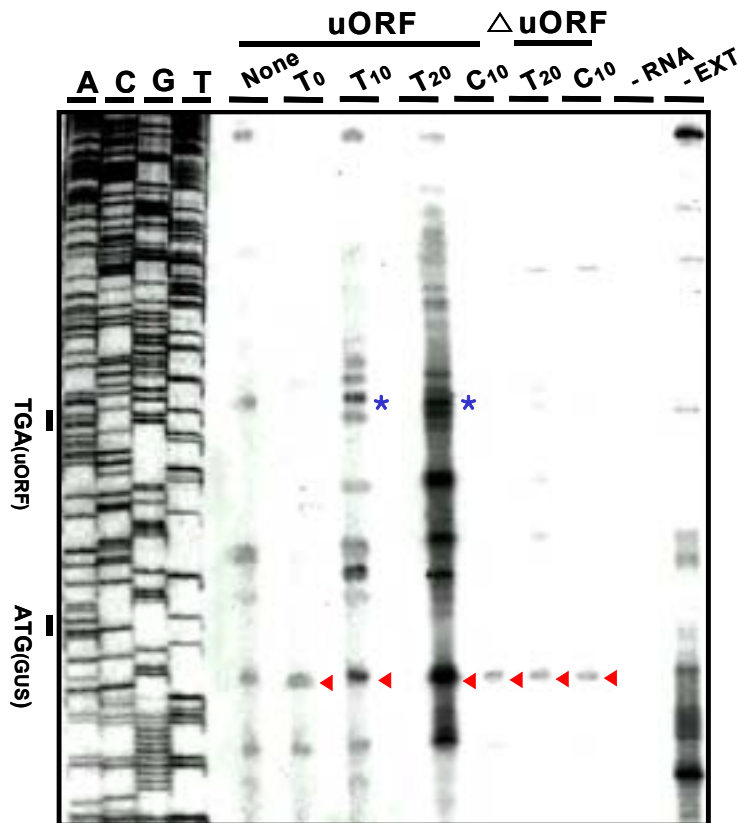


그림 29. SAMDC uORF 유무에 따른 toeprint 변화

◀ : Downstream open reading frame의 start site에서 일어나는 ribosomal stalling
 * : Upstream open reading frame의 termination site에서 일어나는 ribosomal stalling
 (none) ; cycloheximide 첨가없이 20분 동안 반응시킨 것, (T0) ; cycloheximide를 첨가하여 20분 동안 반응시킨 것, (T10) ; cycloheximide 첨가없이 10분 반응 후 cycloheximide를 첨가하여 다시 10분 동안 반응시킨 것, (T20) ; cycloheximide 첨가없이 10분 반응 후 cycloheximide를 첨가하여 다시 20분 동안 반응시킨 것, (C10) ; cycloheximide 첨가없이 20분 동안 반응 후에 cycloheximide를 첨가하여 다시 10분 동안 반응시킨 것, (-RNA) ; mRNA를 첨가하지 않고 20분 동안 반응시킨 것, (-EXT) ; translation extract를 첨가하지 않고 20분 동안 반응시킨 것, 상기의 모든 반응은 25℃에서 수행하였다.

나) uORF protein phosphorylation site의 point mutation에 의한 leaky scanning mechanism

잠재적인 phosphorylation site를 가지는 uORF protein의 구조분석결과 그림 25에서와 같이 uORF protein이 phosphorylation 되었기 때문에, 세포내 uORF 조절과 phosphorylation과 연관되어 있을 가능성이 높다고 판단된다. 그러나 10번, 17번, 28번, 54번을 각각 alanine으로 point mutation 시킨 constructs의 경우 정상적인 translation initiation 즉, leaky scan을 방해하여 GUS의 활성이 낮게 나타났을 가능성을 배제할 수 없다. 따라서 phosphorylation이 일어나는 serine 10번, 17번, 28번, 54번을 각각 alanine으로 point mutation 시킨 constructs를 이용하여 toeprint를 실시하였다. 그림 30은 전반적으로 downstream ORF의 start site 근처에서 강하게 stall된 bands를 보여주고 있다. Serine 10번, 17번을 point mutation 시킨 constructs보다는 serine 28번, 54번을 point mutation 시킨 constructs에서 premature한 mRNA들이 많이 검출되었다. 특히 mRNA template를 첨가하기 전에 extracts에 cycloheximide를 첨가한 것 (T_0)과 mRNA의 translation이 10분 동안 진행된 후에 cycloheximide를 첨가한 것 (T_{10})을 각각 비교했을 때 asterisk으로 표시한 것과 같이 T_0 에서 보이지 않던 bands가 T_{10} 에서 관찰되었다. 이것은 28번 serine 부위와 54번 serine 부위가 mutation된 constructs에서 더 많은 ribosomal stalling이 관찰된 것이다. 또한 downstream ORF의 start site에서의 bands의 크기에 변함이 없는 것으로 보아 plant SAMDC uORF의 작용 기작이 상기와 동일한 leaky scanning 이라는 것을 확인할 수 있었다.

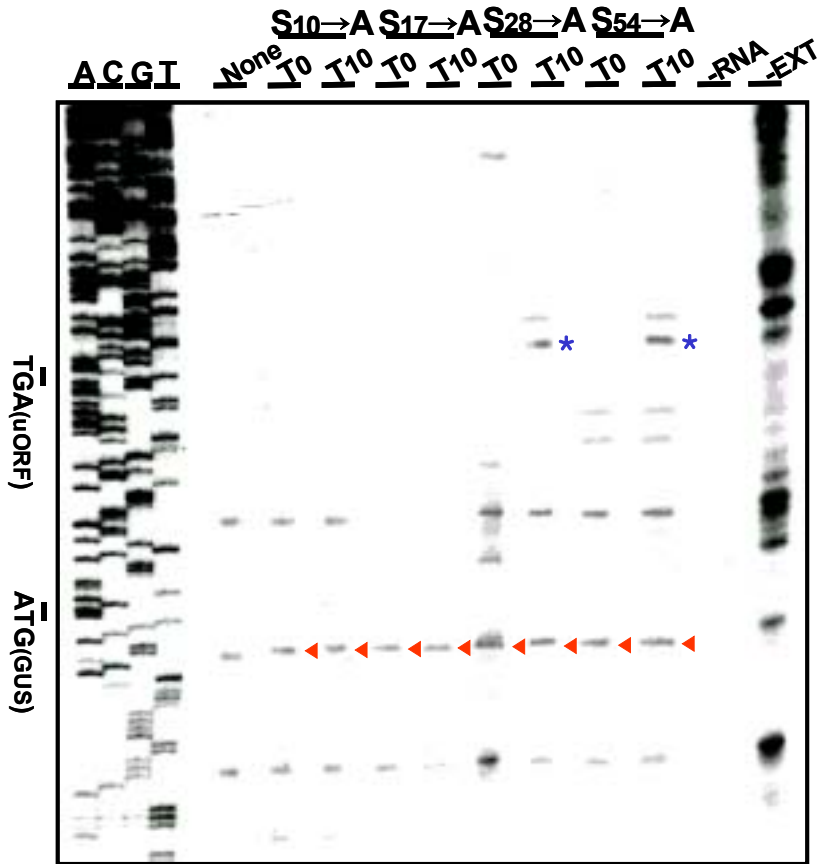


그림 30. SAMDC uORF의 각 point mutant line을 이용한 toeprint

◀ : Downstream open reading frame의 start site에서 일어나는 ribosomal stalling 및 leaky scanning

* : Upstream open reading frame의 termination site에서 일어나는 ribosomal stalling

(none) ; cycloheximide 첨가없이 20분 동안 반응시킨 것, (T0) ; cycloheximide를 첨가하여 20분 동안 반응시킨 것, (T10) ; cycloheximide 첨가없이 10분 동안 반응시킨 후 cycloheximide를 첨가하여 다시 10분 동안 반응시킨 것, (-RNA) ; mRNA를 첨가하지 않고 20분 동안 반응시킨 것, (-EXT) ; translation extract를 첨가하지 않고 20분 동안 반응시킨 것, 상기의 모든 반응은 25°C에서 수행하였다.

8) SAMDC uORF-GFP construct를 이용한 형질전환 담배 식물체와 BY-2 cell 제조

그림 23의 transient expression assay를 통해서 plant SAMDC uORF가 세포질에 존재한다는 것을 확인하였다. 그러나 식물의 SAMDC uORF가 특정 조건에서 localization의 변화가 일어날 가능성을 배제할 수 없다. 그러나 Transient expression assay를 통해서 특정 조건 하에서 단백질의 localization 변화를 파악하는 것은 매우 어렵다. 따라서 plant SAMDC uORF의 localization의 변화 패턴을 살펴보고자 형질전환 담배 식물체 및 형질전환 BY-2 tobacco cell을 제조하였다. 그림 22에서 제조한 35S:uORF-GFP construct를 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용하여 각각 WT 담배 (*Nicotiana tabacum* L. cv Samsun)와 Bright Yellow-2 (BY-2) tobacco (*Nicotiana tabacum*) 현탁 배양세포에 형질전환을 실시하였다.

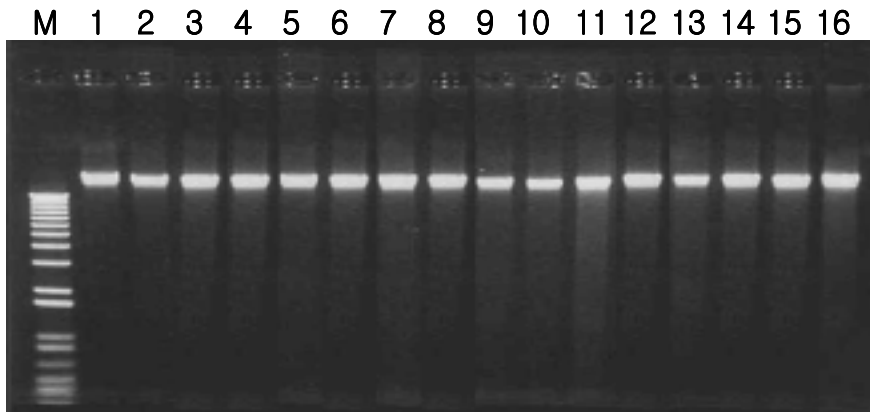
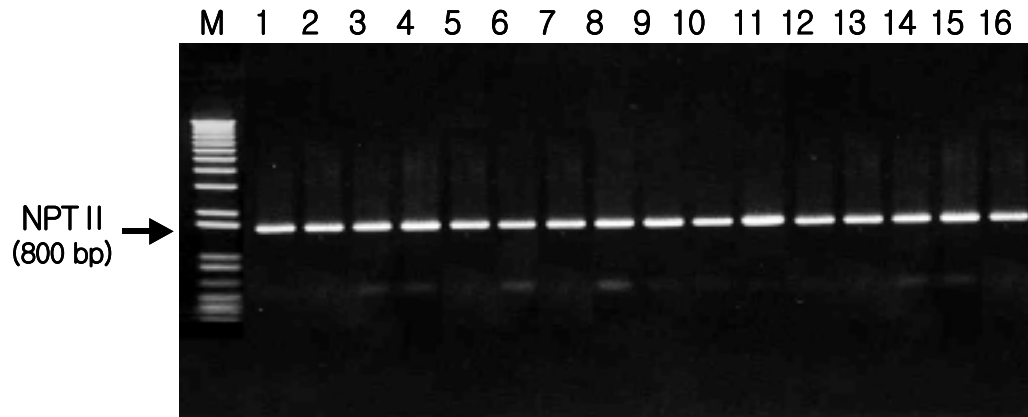


그림 31. 형질전환 담배 식물체 앞에서 genomic DNA를 추출한 후 agarose gel에 전기 영동한 사진

Kanamycin 선별배지에서 재분화된 형질전환 담배 식물체는 genomic DNA를 분리하여 agarose gel 상에서 genomic DNA를 상태를 확인하였으며 (그림 31), 이를 주형으로 PCR을 수행하여 NPT II 부위를 증폭시켰다. 그 결과 35S:uORF-GFP construct를 도입시킨 식물체 16개의 라인 전부에서 약 800bp의 NPT II gene이 증폭되는 것을 확인하였다. 또한 PCR을 통해 uORF 부위를 증폭시킨 것에서도 16개의 라인 전부에서 약 270bp의 uORF gene이 모두 증폭되었다. 따라서 southern blot

hybridization을 수행하여 형질전환체를 좀 더 확실히 선별할 예정이며 T1 - T2 세대를 확보하여 위에서 언급한 여러 가지 실험을 수행할 예정이다 (그림 32).

(A)



(B)

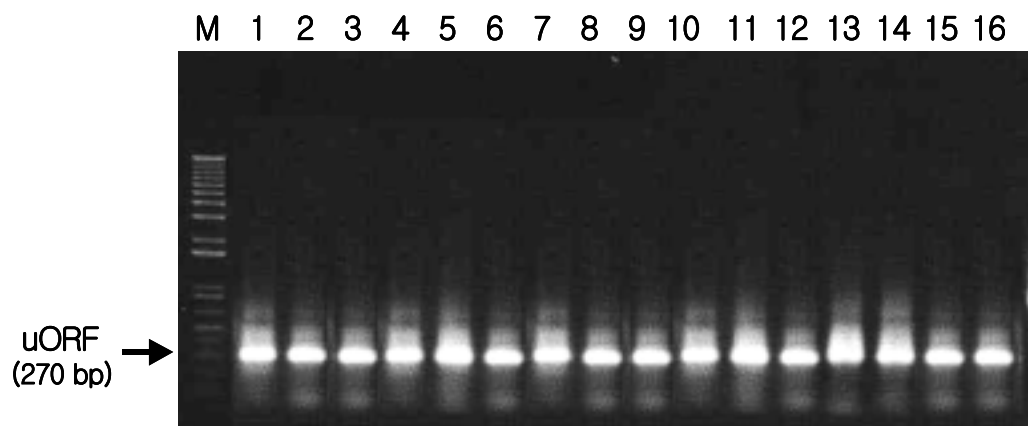


그림 32. 형질전환 담배 식물체 앞에서 genomic DNA를 추출한 후 neomycin phosphotransferase II (NPT II) DNA (A)와 uORF DNA (B)로 PCR 후 agarose gel에 전기 영동한 사진

35S:uORF-GFP construct를 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용하여 BY-2 tobacco cell에 형질전환시켰다. 그림 33의 A와같이 화살표로 표시된 colony들이

kanamycin 선별배지에서 배양한 지 한달 후에 약 100개 정도 생성되었다. 이러한 colony들을 kanamycin 선별배지에서 두 달정도 배양하여 그림 25의 C에서와 같이 왕성하게 성장한 켈러스만을 선별하여 현재는 genomic DNA를 분리하기위해 준비하고 있다. 따라서 genomic DNA를 분리하여 PCR 또는 southern blot hybridization를 통해 형질전환체를 선별한 후 uORF에 의한 cell cycle의 변화 패턴을 살펴보고 uORF의 작용기작을 밝히기 위한 여러 가지 분자생물학적인 실험을 수행할 예정이다.

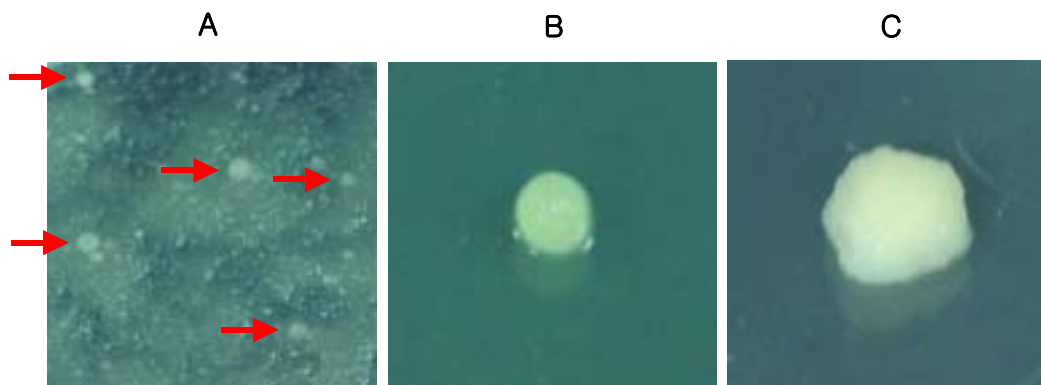


그림 33. 배양기간에 따른 형질전환 BY-2 cell의 colony 형태
(A) 한달, (B) 두달 , (C) 세달

나. 장미형질전환 기술 개발전략 및 장미 조직의 배양

1) 장미형질전환 기술 개발전략

장미는 아직 형질전환 방법이 일반화되어 있지 않았기 때문에 장미 형질전환 기술을 개발하는 것은 매우 어렵고 장기간이 소요된다. 따라서 본 연구에서는 장미 형질전환과정을 세분화하여 각각의 기술을 확보한 후 종합하는 전략을 사용함으로써 기술 개발에 소요되는 시간을 최소화하고자 하였다. 이를 위하여 장미 형질전환과정과 관련된 기술을 그 특성에 따라 세분하였다. 첫째는 장미에서 callus를 유도하는 기술, 둘째 외부 DNA를 형질전환하는 기술, 셋째 형질전환 된 callus에서 shoot을 유도하는 기술 마지막으로 shoot에서 root를 유도하여 식물체를 만드는 기술이다.

각각의 기술에 대한 전략 및 결과를 설명하면 다음과 같다. 네 번째 기술을 개발하기 위해서는 shoot이 필요하지만 callus에서 shoot을 유도할 수 있는 기술이 없는 상태에서 개발하는 것은 불가능하다. 따라서 본 연구에서는 이를 위하여 측아에서 신초를 만들어 식물체를 만드는 방법을 사용하였다. 또한 신초는 조직에 직접 형질전환을 시도할 수 있기 때문에 외부 DNA를 형질전환하는 재료로 유용하게 사용할 수 있다. 세 번째 기술은 아직까지 확립된 바 없는 기술로 알려져 있기 때문에, somatic embryo와 embryogenic callus에서 shoot를 유도하는 방법을 모두 사용하였다. 두 번째 기술 개발을 위해서 *Agrobacterium*과 peptide를 이용하였다. 본 연구팀에서 somatic embryo를 유도하는 기술이 먼저 개발되었기 때문에 이 재료를 이용하였다. 그리고 첫 번째 기술은 일반 캘러스, somatic embryo, 그리고 embryogenic callus로 나누어 시행하였다.

2) 신초를 이용한 식물체 개발 기술

측아를 이용한 형질전환을 수행하기 위해서는 신초의 성장이 원활한 품종을 얻는 것이 중요하다. 따라서 상품성이 높은 장미 14 품종을 대상으로 기내 다량 번식 실험을 수행하였다 (표 5, 그림 34, 35). 신초성장을 위한 배지의 호르몬 조성을 확립하여 위하여 표 5에 제시한 바와 같이 농도 실험을 실시하였다. 표 5에서 보는 바와 같이 3mg/l의 BA, 0.5mg/l의 2,4-D의 배지 조건에서 테스트한 모든 품종에서 원활한 신초성장이 나타났다. 상업적으로 이용되고 있는 장미품종들의 신초성장률을 측정하

기 위하여 측아 채취 후 멸균한 다음 3mg/ℓ의 BA, 0.5mg/ℓ의 2,4-D가 첨가된 MS 배지에 치상하여 2달 동안 배양하였다. 로즈유미와 차밍은 실험에 사용한 모든 측아에서 신초가 형성되었으나 카디날, 노블레스, 레드산드라, 피이스, 스타라이트, 비탈의 순으로 약 40-70% 정도의 신초 형성율을 보였다(그림 34, 35). 그 외 리모나, 콘페티, 씨커스, 리틀마블, 입센로랑 등의 품종에서는 신초가 전혀 형성 되지 않았다. 그러나 차밍과 리틀마블의 경우 0.2mg/ℓ의 BA, 2mg/ℓ의 2,4-D가 첨가된 MS 배지에서는 캘러스가 유도되었다.

표 5. 호르몬의 조성에 따른 장미의 생장을 비교

장미품종	호르몬 조성	생장을
차밍 카디날 로즈유미	0.2mg/ℓ BA, 2mg/ℓ 2,4-D	80-90%이상
비탈 피이스 노블레스	0.5mg/ℓ BA, 3mg/ℓ 2,4-D	50%
심파스 리틀마블	1mg/ℓ BA, 2mg/ℓ 2,4-D	40%미만

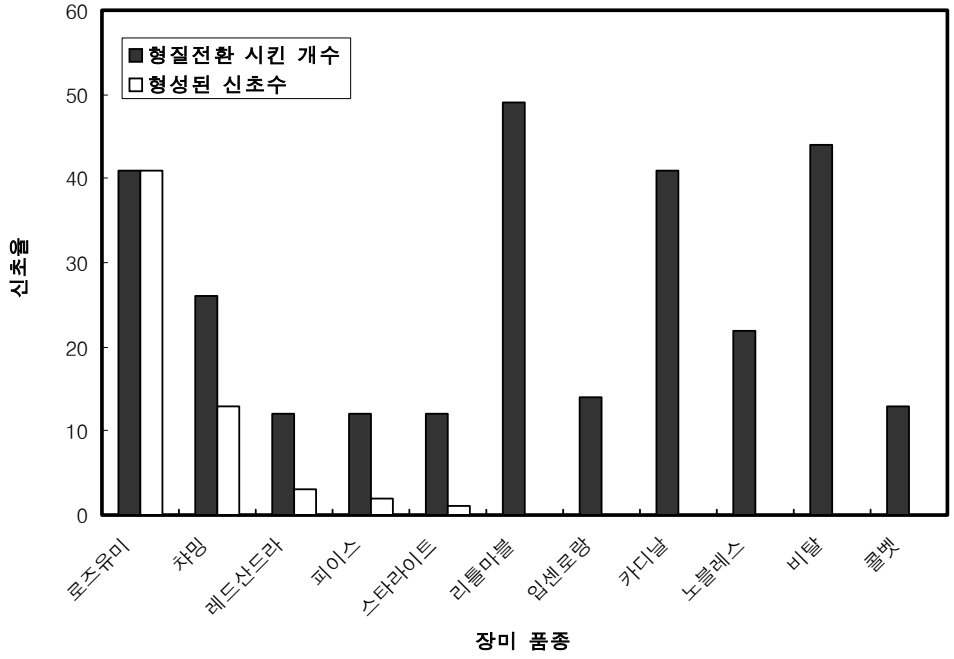


그림 34. 장미 품종별 측아로부터의 신초 형성률

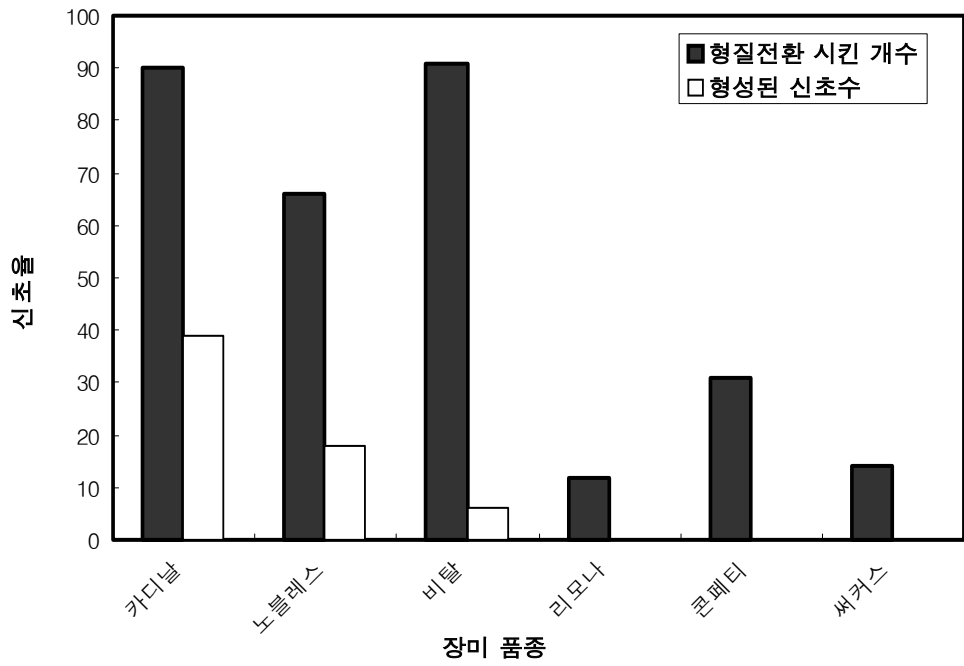


그림 35. 장미 품종별 측아로부터의 신초 형성률

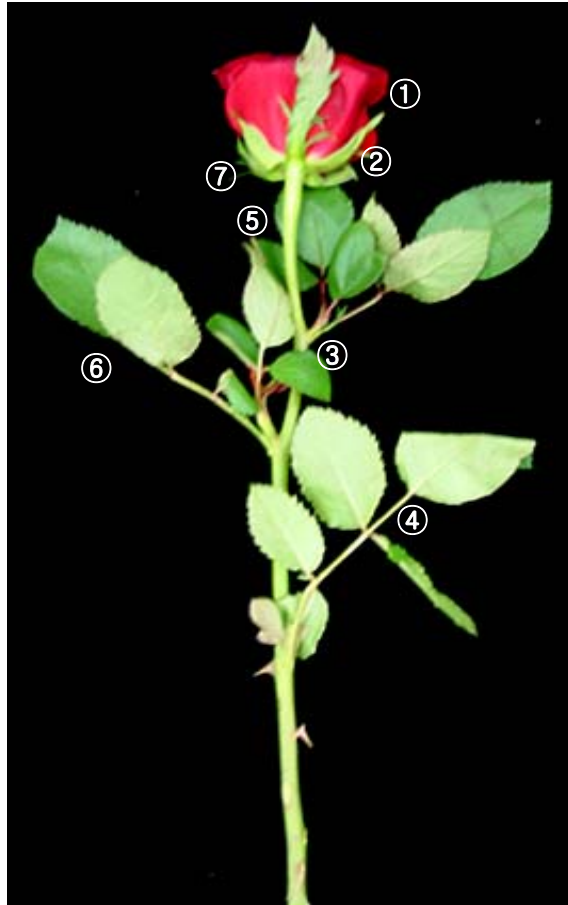


그림 36. 장미 신초형성을 위해 계대배양에 사용한 조직

1: 꽃잎, 2: 꽃(수술과 암술), 3: 액아, 4: petiole, 5: 줄기, 6: 잎, 7: 꽃(화분관을 포함)

또한, 장미 품종별 측아로부터의 신초 형성률을 확인한 후 비율이 높은 차밍, 카디날, 로즈유미를 이용하여 조직별로 계대배양을 하였다 (그림 36, 37).

조직은 꽃잎, 꽃(수술과 암술, 화분관을 포함한 부분), 액아, petiole, 줄기, 잎의 여러부분을 나누어서 시행한 결과, 그중에서 신초대부분이 액아에서 형성되는 것을 확인할 수 있었으며 petiole, 화분관, 수술과 암술을 포함하는 꽃 부분에서는 callus가 형성되는 것을 보였다. Petiole, 화분관, 수술과 암술을 포함하는 꽃은 callus 형성에 필요한 조직으로 사용하였다 (표 6). 다른 꽃잎, 줄기, 잎은 신초나 callus형성이 전혀 되지 않아 조직으로 사용하기에는 미흡하다고 판단되어 제외하였다.

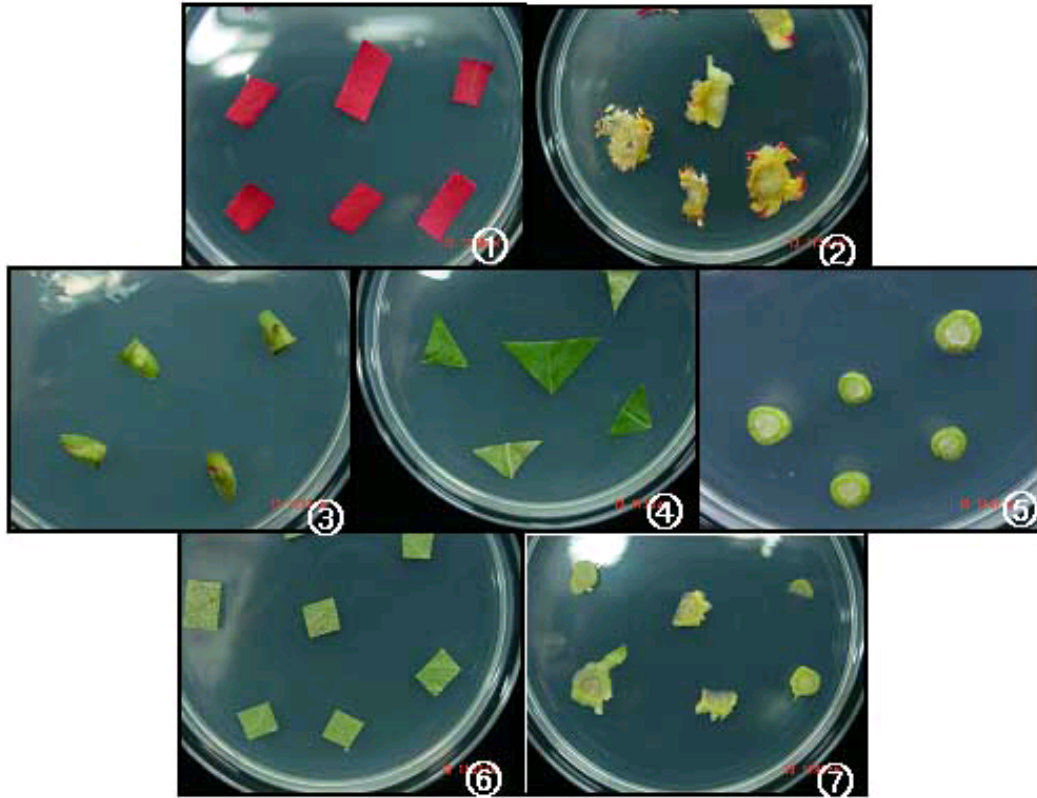


그림 37. 장미 신초형성을 위해 조직별로 분리하여 치상한 상태
 1: 꽃잎, 2: 꽃(수술과 암술), 3: 액아, 4: petiole, 5: 줄기, 6: 잎, 7: 꽃(화분관을 포함)

표 6. 장미 조직에 따른 장미의 신초형성을 비교

장미조직	신초형성율(%)	비고
꽃잎	0	
꽃(수술과 암술)	0	신초가 아닌 약 3%의 callus가 형성
액아	98	
petiole	0	신초가 아닌 약 3%의 callus가 형성
줄기	0	
잎	0	
꽃(화분관을 포함)	0	신초가 아닌 약 3%의 callus가 형성

상기 실험에서 얻은 신초는 1mg/l의 2,4-D가 첨가된 root inducing 배지에 치상하여 2달 동안 배양할 경우 뿌리를 유도할 수 있었으며, 이를 화분에 옮겨 심어 새로운 개체를 만들어 꽃의 개화를 확인할 수 있었다 (그림 38, 39).

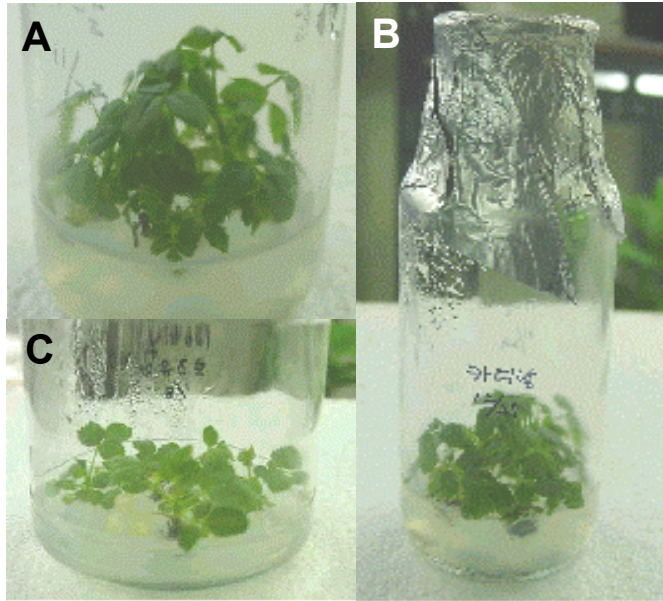


그림 38. 액아에서 재분화시킨 후 2개월정도 경과한 카디날과 로즈유미의
신초 형성

(A) 로즈유미 (B) 카디날 (C) 로즈유미

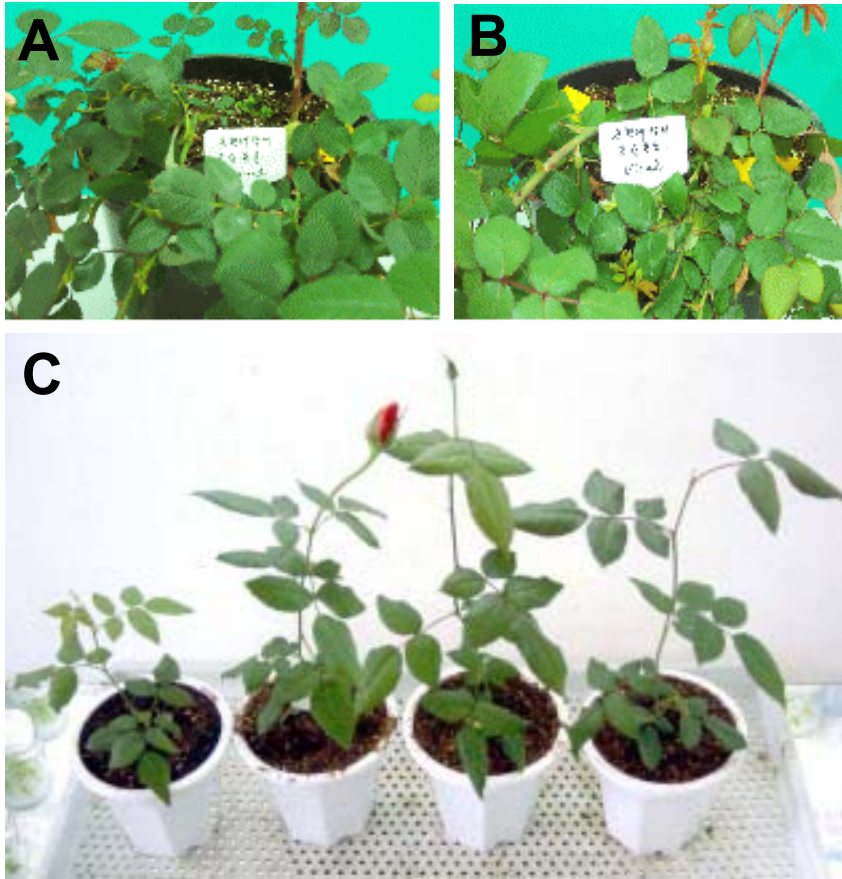


그림 39. 토양에서 1개월 순화시킨 재분화 장미
A. 로즈유미 B. 비탈 C. 카디날

3) 장미 조직으로부터 somatic embryo genesis 유도

가) 장미의 조직 중 petiole을 이용하여 somatic embryo를 유도

새로운 유전자 도입을 위한 가장 효율적인 방법으로 somatic embryogenic callus를 유도하여 형질 전환하는 방법을 생각할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 앞서 확인한 그림 36, 그림 37, 표 6에서 알 수 있듯이 petiole에서는 장미의 조직보다는 callus가 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 이를 바탕으로 먼저 장미 품종별 callus를 유도

능을 확인하기 위해 먼저 장미의 종류별로 petiole을 잘라서 MS(Murashige and skoog medium) salts, vitamine, 5mg/l의 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid), 30g/l의 sucrose, 300mg/l의 L-proline과 4g/l의 agarose, pH 5.8로 구성된 preculture medium에 치상하여 28℃, 암실에서 유지하였다. 고농도의 auxin은 callus의 형성을 유도하는데 사용하였다. 14일간 배양한 후 MS salts, vitamine, 3mg/l의 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid), 30g/l의 sucrose, 300mg/l의 L-proline과 4g/l의 agarose, pH 5.8로 구성된 embryo proliferation medium에 치상하여 28℃, 암실에서 유지하였고, 28일 간격으로 계대 배양을 실시하였다. 이러한 캘러스 유도 과정은 그림 40에 모식도로 나타내었다.

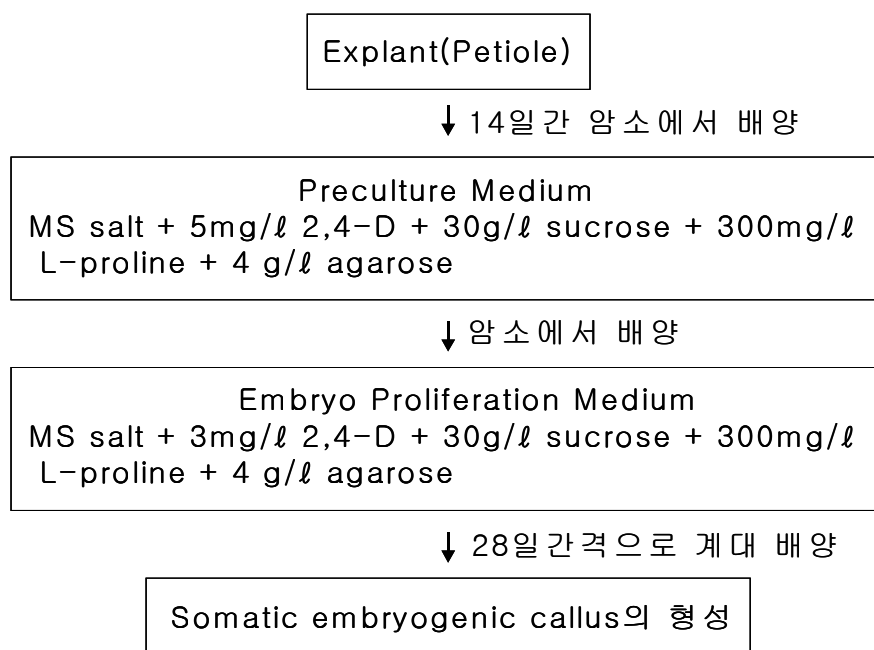


그림 40. 장미의 petiole 부분을 이용하여 callus 유도과정

각각의 장미의 종류에 따른 callus 형성율을 나타냈다 (표 7). 피이스, 로즈유미, 심 파스, 카디날, 차밍, 비탈 등의 6개 품종을 기내에서 배양한 무균 장미 petiole을 이용한 실험에서 피이스와 로즈유미가 처음에는 callus유도가 빠르게 진행되었으나 로즈유미는 2,4-D 3ppm의 호르몬을 이용한 배지에서 배양 후 regeneration이 가능한 callus로 전환시키기 위해 IAA 3ppm으로 전환하였으나 호르몬 조건의 부적합으로 시간이

경과함에 따라 callus보다는 rooting이 유도되어짐을 볼 수 있었고 비탈의 경우에는 rooting이나 배발생 callus가 거의 형성되지 않았다. 이를 해결하기 위해 로즈유미는 호르몬을 3ppm의 2,4-D를 0.5ppm-2ppm으로 농도를 낮추어 2,4-D를 처리하고, 1ppm-2ppm의 picloram을 사용하여 callus를 유도하였다. 그 결과 2,4-D를 0.5ppm으로 사용하여 처리한 조직에서 callus가 가장 많이 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 심파스와 카디날 역시 호르몬의 조성을 달리하여 사용하였을 때 callus가 형성되는 것을 확인하였다.

표 7. 장미 종류에 따른 callus 형성능 비교

장미 종류	callus의 형성률(%)
피이스	38
로즈유미	36
심파스	33
카디날	29
차밍	13
비탈	0

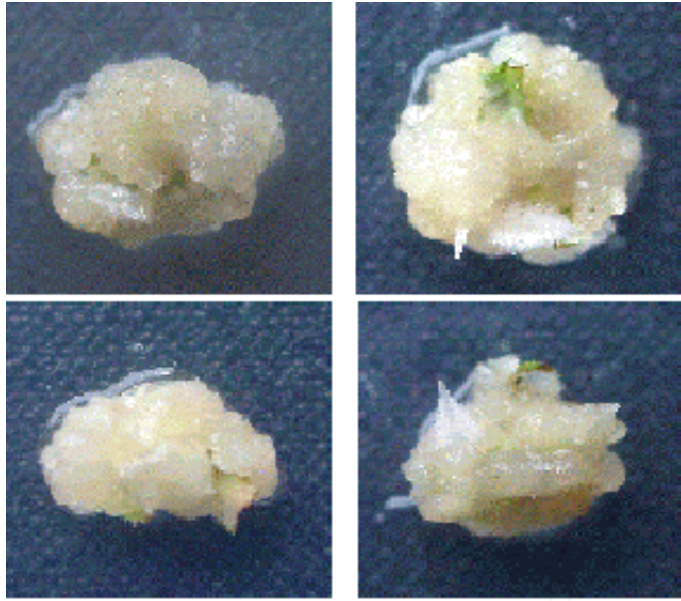


그림 41. 장미 petiole로부터 유도되어 4주 경과한 로즈유미 캘러스

그림 41과 42는 상기 callus 유도과정을 통하여 유도한 callus로 각각 4주와 8주가 지난 후 캘러스의 모습을 나타낸 것이다. 이러한 캘러스는 regeneration이 불가능한 callus로 알려져 본 실험에서 형질전환을 위한 재료로 사용할 수 없었다.

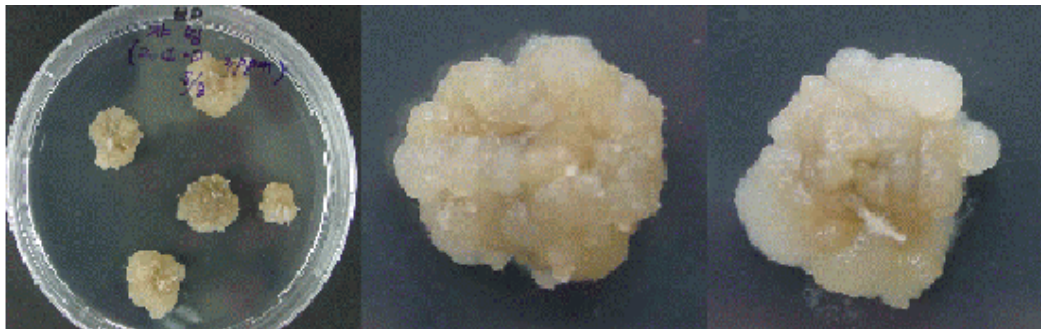


그림 42. 8주 경과한 계대배양 중의 로즈유미 캘러스

이렇게 유도된 callus의 배양조건을 달리하여 배양하였다 (그림 43). 2,4-D 3ppm을 IAA 2ppm으로 전환하여 배양 후 somatic embryo를 유도하려 하였으나 오히려 root가 형성이 되어 형질전환에 적합한 재료로 사용할 수 없었다.

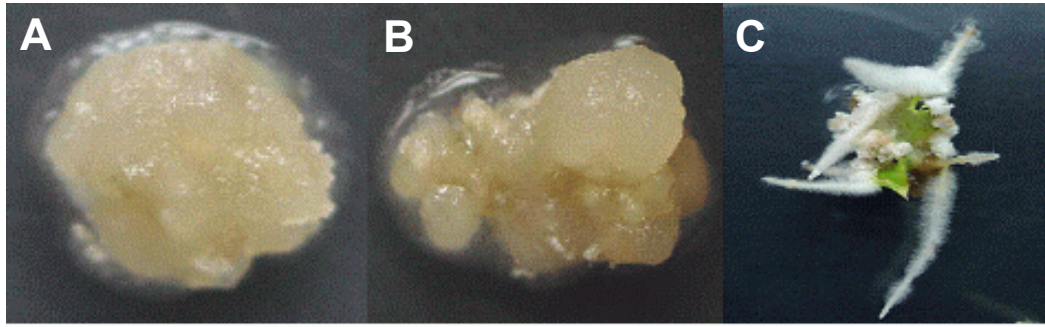


그림 43. 호르몬 조성을 달리하여 배양한 로즈유미 캘러스

A와 B: 8주정도경과한 로즈유미 캘러스

C: 8주정도 경과한 로즈유미 캘러스를 이용하여 호르몬 조성을 달리하여 배양 후 3주경과

나) 조직 중 분열조직을 이용한 somatic embryogenesis 유도

기존 보고에 의하면 장미조직을 재분화시키는데 있어서 node, leaf, immature leaf, stem, filament, ovule, petiole 등의 여러 부분이 사용되었다. 이러한 것들은 somatic embryo를 형성하는데 있어서 기반이 되는데, 체세포배발생 callus는 식물 형질전환 및 대량증식에 좋은 재료로 사용되고 있다. 왜냐하면 다른 방법에 비하여 다량의 개체를 얻을 수 있어, 형질전환 시 그 확률을 높일 수 있기 때문이다. 그러나 장미의 경우 일부 보고가 있으나 기존의 배양 및 과정 속에서 somatic embryo의 재분화에 관련된 연구결과 및 정보를 수집하는 것이 어려웠다. 따라서 적절한 호르몬 조성을 평가하는 것은 배발생 캘러스 유도에 있어서 중요한 핵심과제라 할 수 있다. 아울러 형성된 somatic embryo에서 shooting을 유도하는 것이 매우 어려운 과정이다. 이러한 단점을 가지고 있음에도 불구하고 일단 그 과정이 확립될 경우 매우 빠르게 식물 형질전환 및 대량증식이 가능하다는 이점 때문에 배발생 캘러스를 장미 형질전환에 이용할 재료로 개발하고자 하였다. 그리고 somatic embryo는 광조건과 암조건 모두에서 유도할 수 있으나 본 연구에서는 광조건하에서 유도하는 방법을 사용하였다.

본 연구에서 앞서 분석한 신초 형성능과 캘러스 형성능 결과를 통하여 로즈유미가 본 실험에 가장 적합한 품종으로 판단되는 바 이 품종을 이용하여 측아와 분열능이 왕성한 미숙아를 사용하여 somatic embryo를 유도하였다. 기본배지로서 MS 4.3g, Sucrose 30g/l, phyta-gel 3g/l, casein 0.5g/l 과 호르몬인 2,4-D, picloram, NAA

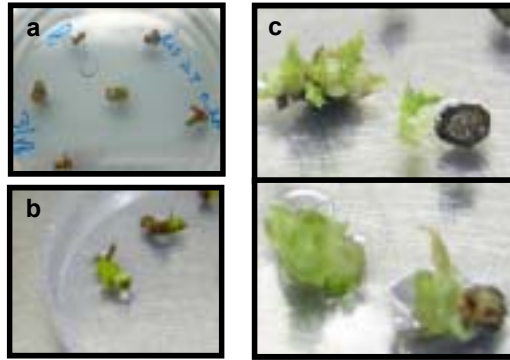
를 첨가하여 관찰하였다. 본 연구에 사용한 각각의 농도는 표 8에 나타낸 바와 같다. 각 호르몬 조성의 배지에 장미조직을 치상하여 callus를 유도하고 이들을 배양하여 somatic embryo를 육안으로 판별하였다.

표 8. 장미의 분열조직을 이용하여 somatic embryo를 유도하는 조건

	호르몬	농도 (mg/ℓ)
1	2,4-D	1
2		2
3		3
4	NAA	1
5		2
6	Pic	1
7		3

육안으로 판별한 somatic embryo 생성율을 분석한 결과 2,4-D가 2mg/l 들어간 배지 조건에서 가장 잘 생성됨을 확인하였다 (표 9). 따라서 이 배지 조건을 이용하여 분열조직에서 somatic embryo를 유도하였다(그림 44, 그림 45). 로즈유미의 분열조직이 포함된 부분을 절단하여 치상 한 후 약 1주일정도가 경과하면 조직에서 callus가 형성되는 것을 육안으로 확인할 수 있었다. 이렇게 형성된 callus를 분리하여 새로운 배지에 치상한 후 약 2주정도가 경과하게 되면 조직에서 배발생 callus와 비배발생 callus가 동시에 형성되는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 44, C의 화살표). 이중에서 표시된 것과 같은 callus만을 따로 분리하여 배양한 후 싌초를 유도하거나 직접 형질 전환 시키기 위해 사용하였다.

A.



B.



C.

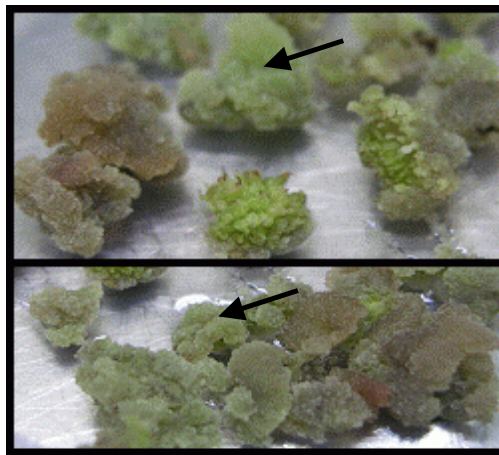


그림 44. 로즈유미를 이용하여 somatic embryo를 유도하는 과정

A: 치상(a)한 후 약 1주일정도 경과 B: 형성된 callus

C: 4주정도 경과한 로즈유미 캘러스

표 9. 분열조직을 이용한 callus 형성을 (표 8. 참고)

	callus의 형성정도	배발생 callus의 형성정도
1	+++	+
2	+++	+
3	+++	++
4	++	-
5	++	-
6	+++	--
7	+++	--

+++는 callus의 형성율이 80% 이상, ++는 60%, +는 callus의 형성율이 50%, -는 30%, --는 20%이하

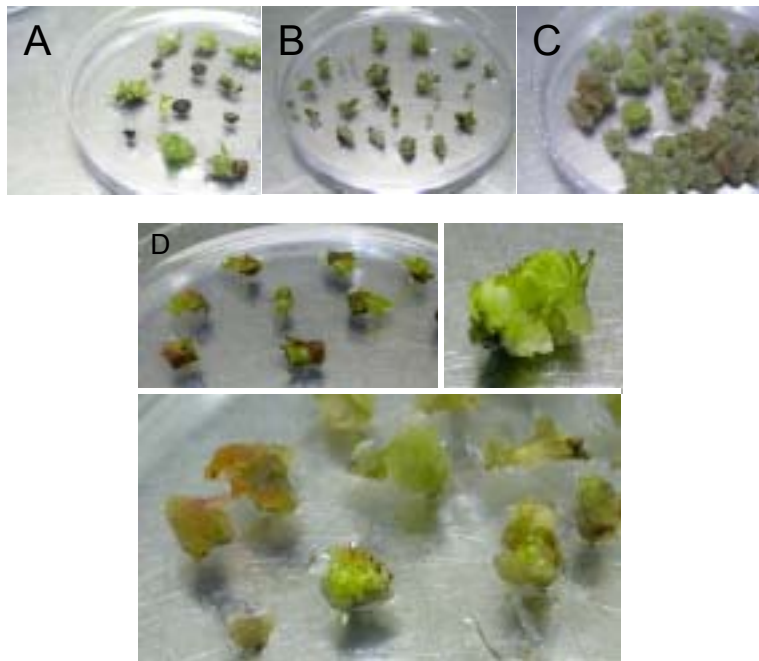


그림 45. 로즈유미에서 somatic embryo를 유도
 A. Callus를 유도하기 위해 조직을 치상하고 일주일경과
 B. 보름경과 C, D. 한달경과

Somatic embryo는 explant로부터 형성이 되는데, somatic embryo로부터 하나의 유전자 조작 plant를 완성하는데 까지 최대한 많이 유도하는데 있어서 직·간접적으로 이용되므로 유용하게 쓰인다. Immature zygotic embryo는 장미 plant로부터 분리해낼 수 있는데, 이것은 암조건에서 somatic embryo를 유도하는 explant로써 사용이 된다. Immature zygotic embryo는 1/2MS 배지(Murashige and skoog salt 2.15g/l , thiamine·HCl 0.4mg/l , nicotinic acid 0.1mg/l , pyridoxine·HCl 0.5mg/l , glycine 2mg/l , myo-inositol 100mg/l , 3% sucrose, 0.4% gelrite, pH 5.8)에서 25℃, 광조건 아래에서 각각 4주 간격으로 계대 배양하였다. 이 때 배지에는 각각의 적정농도의 1.36μM의 2,4-D 와 4.44μM의 BA를 첨가하였다. 약 8주정도가 지나 somatic embryo가 생겨나는 것을 확인할 수 있었다. 이때 scalpel과 forcep을 이용하여 1mg/l의 2,4-D와 1mg/l의 picloram이 각각 첨가된 배지로 옮겨주었다.

우리는 장미 중에서 로즈유미와 차밍, 비탈, 심파스를 이용하여 somatic embryo callus를 유도하였으나 이 중에서 심파스와 로즈유미의 callus 형성이 빠르게 진행되는 것을 확인할 수 있었다(그림 46, 그림 47). 그러나 비탈의 경우에는 callus가 거의 형성이 되지 않고 오히려 rooting이나 비배발생 callus가 유도되어짐을 볼 수 있었고 이는 호르몬의 조건이 적합하지 못한 것으로 보여진다. 이를 해결하기 위해서 2,4-D의 농도를 낮추거나 2,4-D 대신 picloram과 같은 다른 호르몬을 사용하여 callus를 유도하였으나, 비탈에서는 callus의 형성을 확인할 수 없었다.

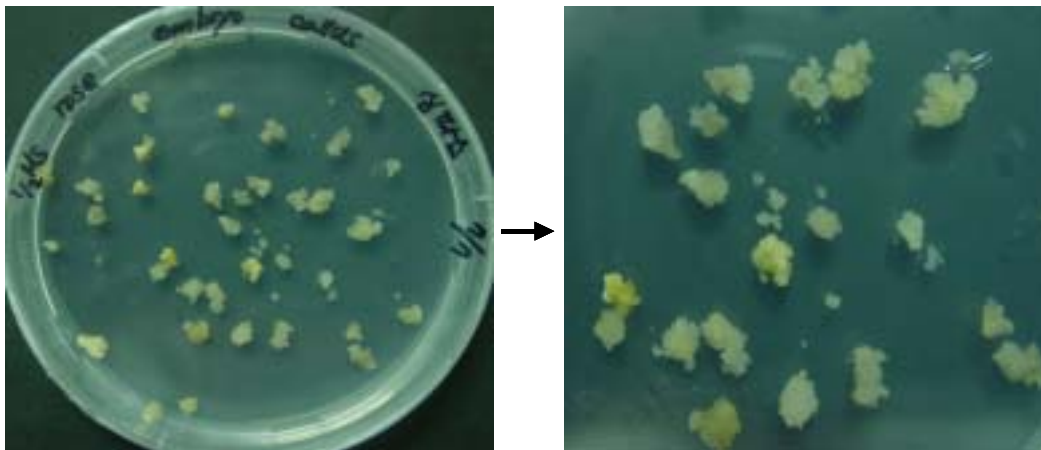


그림 46. 심파스에서 유도된 somatic embryo callus

오른쪽: 확대한 사진

심파스에서 somatic embryo callus를 유도하였고 이들을 사용하여 형질전환 실험

에 이용하였다. 각각 4주 간격으로 계대배양하면서 1/2MS 배지에서 증식시켰다. 우리가 보유하고 있는 다른 장미의 종류, 차밍, 비탈, 피이스 등을 같은 방법으로 embryo callus를 유도하였으나 다른 종류보다 심파스와 로즈유미의 callus 유도율이 가장 높았다.

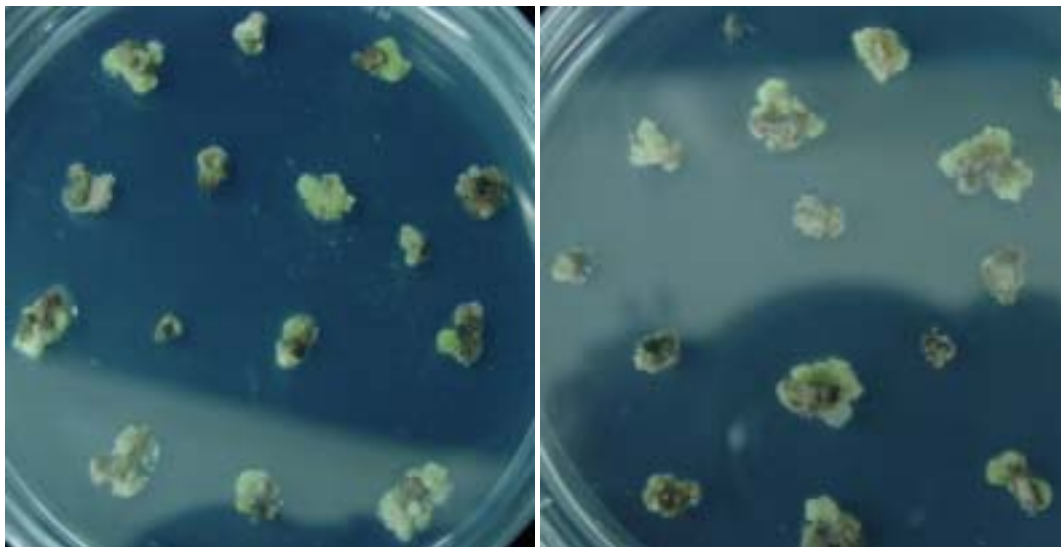


그림 47. 로즈유미에서 유도된 somatic embryo callus

로즈유미에서 유도된 callus의 증식율이 매우 활발하였으며 이중에서 shooting으로 분화할 수 있는 좋은 조직만을 선별하여 형질전환에 사용하였다.

4) 장미의 형질전환 기술

가) 형질전환기술

Plant에서의 gene transformation은 지난 30여 년간 광범위하게 진행되어 왔다. 다양한 방법에 의한 gene delivery 후 transformed cell들은 selection의 과정을 거쳐 transgenic plant로 regeneration되었다. 현재까지 주로 사용되는 gene delivery technique은 *Agrobacterium*-mediated transformation, Particle gun, Electroporation 그리고, PEG(polyethylene glycol)- mediated transformation 이다.

이들 방법을 이용한 transformation은 방대한 양의 tissue culture가 필연적으로 수반되며, transgenic plant를 얻기까지 많은 시간과 비용이 요구되어, 다양한 plant

species에서 만족할 만한 결과를 얻고 있지 못하고 있다. 예를 들어 대부분의 중요한 작물들을 포함하는 monocot plant의 transformation에서 *Agrobacterium*-mediated transformation은 그 효율이 극히 미미한 것으로 알려져 있다. 이렇게 낮은 수준의 gene delivery efficiency와 cell wall로 인한 장애 등 기존의 method들이 공통으로 가지는 문제점들의 극복이 요구되고 있다.

나) Peptide를 이용한 형질전환기술 개론

기존의 plant transformation method들이 가지는 단점 및 한계들을 극복하기 위해 mammalian cell들의 transformation에서 효과적으로 사용되고 있는 cationic oligopeptide 방법이 있다. 이 방법은 cationic carrier와 DNA charge간의 electrostatic interaction에 의해 stable한 complex가 형성되는 원리를 이용한 것으로, 이렇게 형성된 complex의 특성은 cell membrane을 penetration하여 최종적으로 nucleus targeting을 할 수 있다.

이들 cationic oligopeptide 중 arginine, lysine으로 구성된 polypeptide들은 membrane penetration과 nucleus targeting에 있어서 그 효율이 매우 높음이 보고되고 있다. 이 system은 mammalian cell들에 있어 현재 각광받는 gene delivery method로 사용되고 있으며 이에 대한 연구를 통해 이 system이 다른 여타의 direct gene delivery system을 대체할 수 있다는 가능성이 제시되고 있다.

Gene delivery efficiency는 peptide length와 amino acid의 조합에 따라 많은 차이를 나타내는데, 대부분의 연구들은 각각의 factor들의 modification을 통한 최적화된 vector를 개발하는데 초점이 맞추어지고 있다. Cationic peptide들은 DNA complex 형성 시 negative charge의 nucleotide를 aggregation하여 homogeneous한 particle을 형성하게 하며, 이 때 형성된 surface peptide shell의 net positive charge는 negative charge의 membrane lipid와 interaction에 중요한 것으로 보고 되었다.

일반적으로 NLS(nucleus localization signal)에 의한 nucleus targeting은 특정길이의 arginine, lysine이 연속되는 구조에 의해 promote되는데, 이들 cationic polypeptide들은 NLS를 포함하는 구조를 가지고 있어, peptide/DNA complex의 membrane penetration 후 nucleus targeting이 promote 되어 DNA delivery가 일어나게 된다.

장미를 형질전환하는 방법으로는 기존의 방법을 모두 사용할 수 있다. 그러나 본 연구에서는 시간 및 장비의 제한으로 인하여 *Agrobacterium* 도입법과 Peptide를 이

용하는 방법을 사용하였다. 형질전환 기술을 개발하기 위하여 사용한 조직은 신초와 또는 분열이 왕성한 조직과 somatic embryo를 이용하였는데, 상기 조직이 embryogenic callus보다 일찍 개발되었기 때문에 이 조직을 사용하여 기존에 알려진 형질전환 기술을 접목하여 장미에서 수행하는 방법을 확립하였다.

(1) *Agrobacterium*을 이용한 형질전환

(가) 신초 유도과정을 이용한 *Agrobacterium* 도입

형질전환 방법으로 SAMDC 유전자를 포함하는 *Agrobacterium*을 제조하였고, 이를 이용하여 장미 조직 자체에 직접 도입시키는 형질전환 실험을 수행하였다. 이 때 형질전환에 사용한 장미로는 로즈유미, 비탈, 차밍 등을 이용하여 먼저 장미의 조직 중 분열이 가장 왕성하게 일어나는 기내 배양되고 있는 장미의 어린조직을 분리하여 외래유전자를 갖고 있는 *Agrobacterium*과 7일간의 공조배양 후 MS salts, vitamine, 0.2mg/l의 NAA, 2mg/l의 BA, 30g/l의 sucrose, 300mg/l의 L-proline과 4g/l의 agarose, pH 5.8로 구성된 preculture medium에 100mg/l의 kanamycin과 500mg/l의 cefotaxime의 항생제를 포함한 선택배지에 치상하여 밝은 곳에서 배양하여 유전자 형질전환 여부 및 신초 형성정도를 관찰하였다(그림 48). 그러나, *Agrobacterium*을 감염 시킨 후 약 5주 정도는 조직자체에서 신초가 형성되고 높은 농도로 항생제가 포함된 배지에서 잘 자라는 것처럼 나타났다 (그림 49). 그러나 약 9주 정도가 되면 신초가 자라지 않고 장미 조직의 바깥부분이 노랗게 변하는 등 항생제가 포함된 배지에서 잘 자라지 못하고 사멸되었다. 따라서 약 7주정도가 된 장미조직을 node마다 절단하여 항생제가 포함된 배지에서 독립적으로 배양하였으나 (그림 50), 약 4주정도 지나면 서 이미 죽어가는 것을 확인 할 수 있었다.

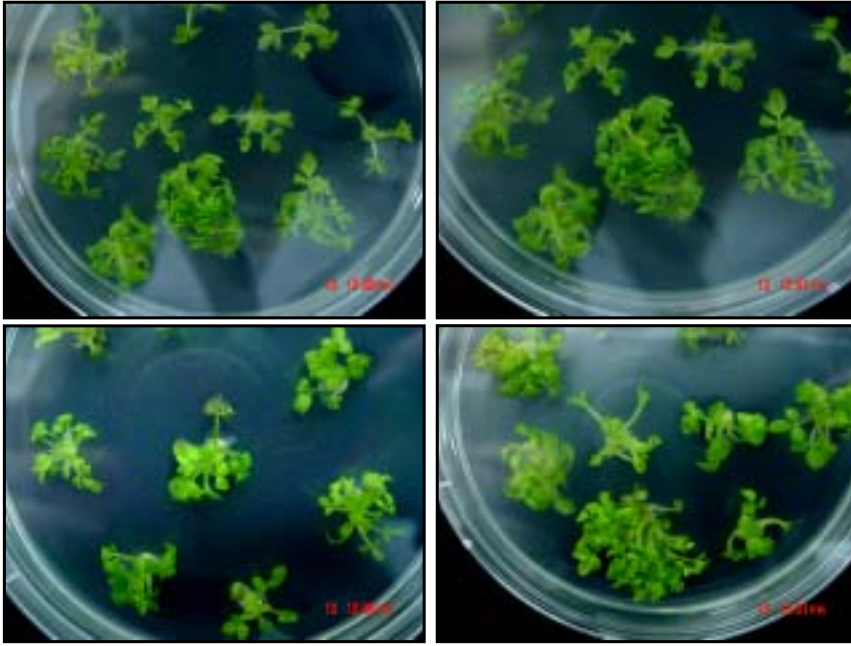


그림 48. 형질전환 시킨 후 약 2주경과 된 로즈유미 조직

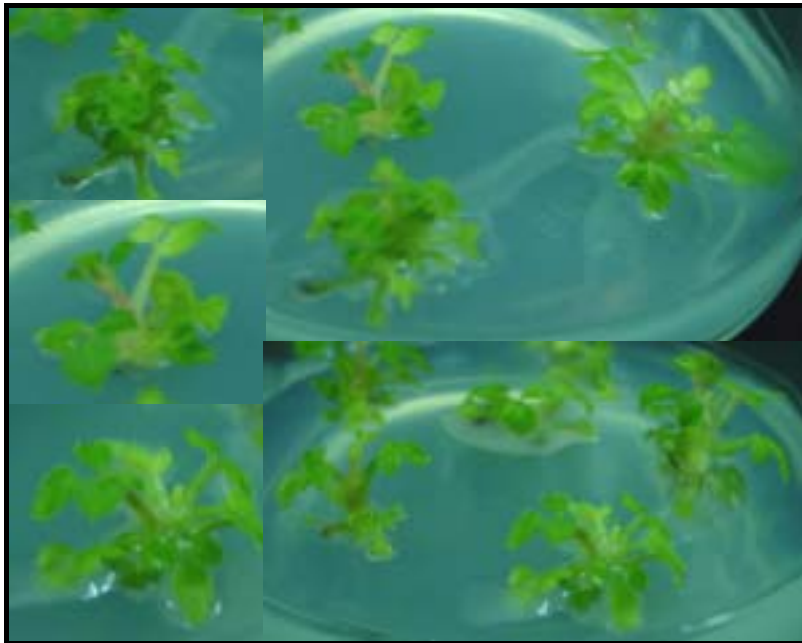


그림 49. 형질전환 시킨 후 약 5주경과 된 로즈유미 조직

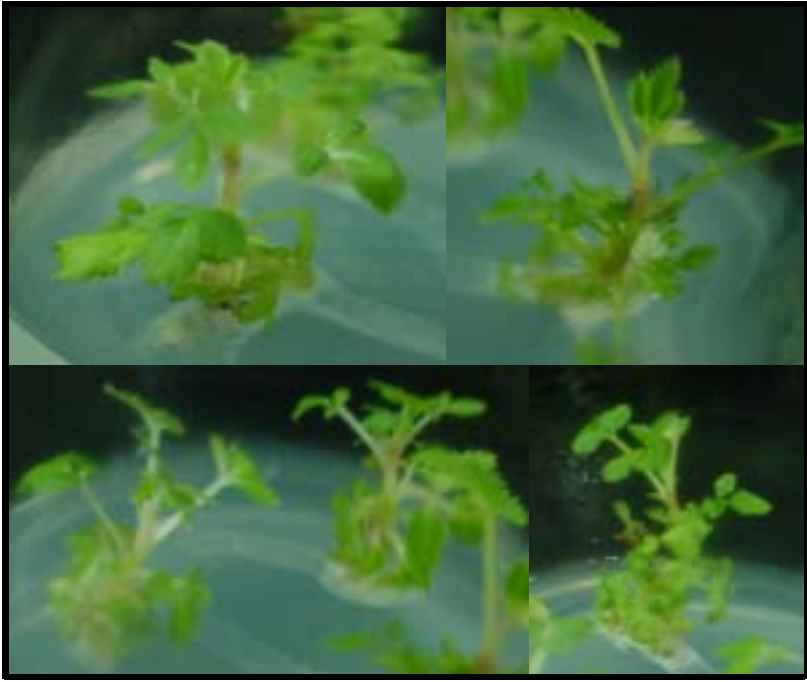


그림 50. 형질전환 시킨 후 7주경과 한 로즈유미를 선별하여 node-culture배양

장미의 품종개량을 위하여 외래유전자인 카네이션의 SAMDC 유전자를 *Agrobacterium*을 이용하여 측아에 도입시킨 형질전환 실험에서는 장미의 측아와 외래유전자를 갖고 있는 *Agrobacterium*과의 2일간의 공조배양 후 3 mg/l의 BA, 0.5 mg/l의 2,4-D와 항생제 100 mg/l의 kanamycin과 500 mg/l의 carbenicillin 이 첨가된 MS 선택배지에 치상하여 2.5달 동안 배양하여 신초형성 정도를 측정한 결과 (그림 51와 그림 52) 로즈유미에서 가장 높은 신초형성율을 보였으며 차밍, 비탈, 카디날등이 비교적 높은 신초형성율을 보였다. 그러나 6주정도 경과하게 되면 형질전환시킨 신초들이 황색으로 변하여 죽는 것을 확인하였다.

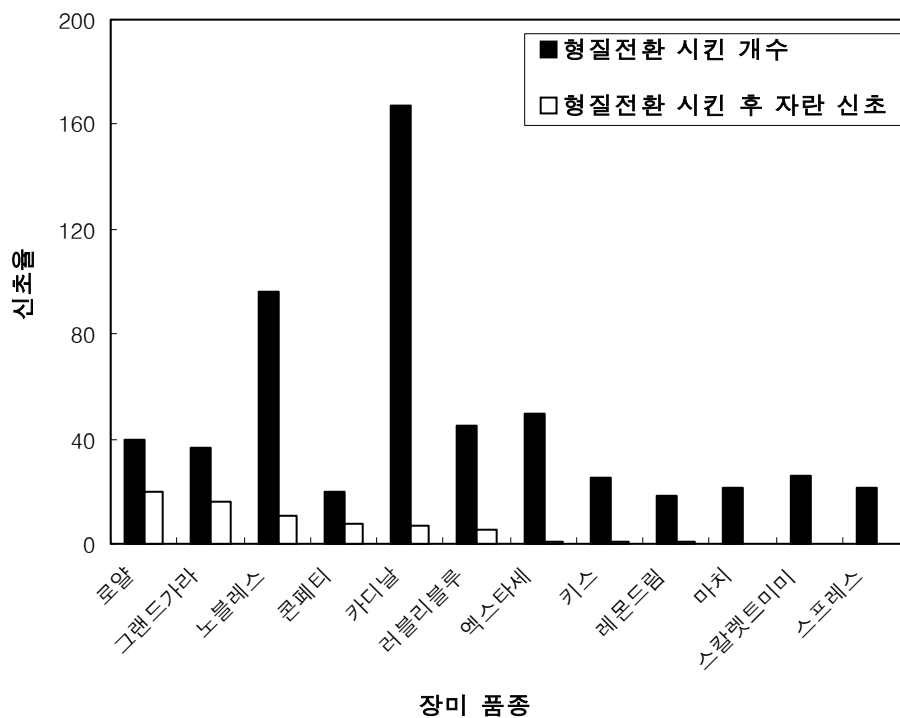


그림 51. 장미 품종별 형질전환 시킨 후 약 5주 경과하여 측정한 신초 형성률

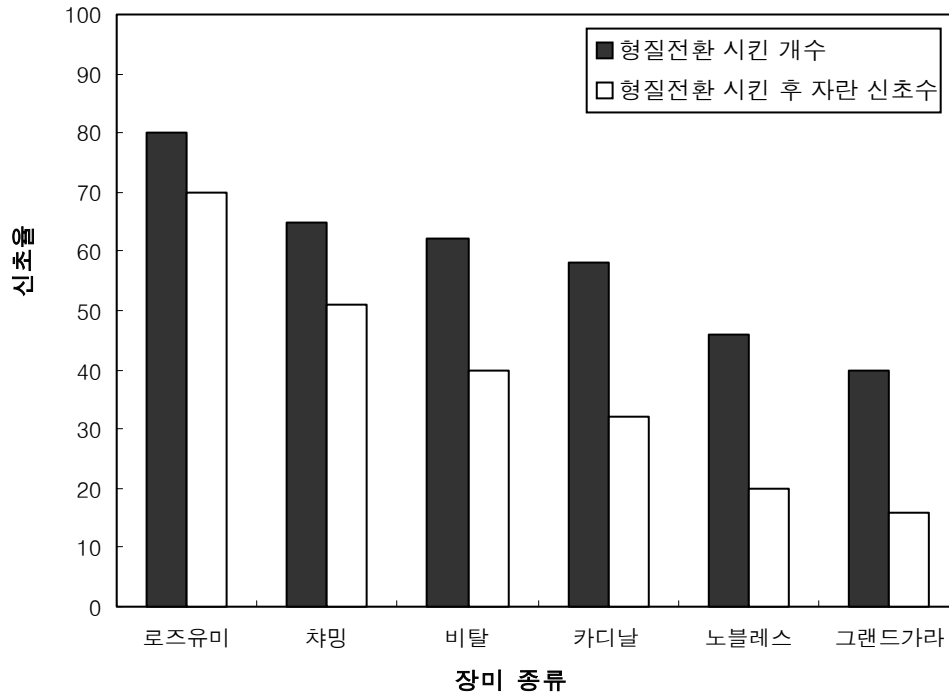


그림 52. 장미 품종별 형질전환 시킨 후 약 6주 경과하여 측정된 신초 형성률

(나) 장미 somatic embryo에 유전자를 포함한 *Agrobacterium*을 도입

① 장미의 조직 중 petiole에 유전자를 포함한 *Agrobacterium* 도입

외래유전자인 카네이션의 SAMDC 유전자를 *Agrobacterium*을 이용하여 petiole에 직접 도입시키는 형질전환 실험을 수행하였다. 이 때 형질전환에 사용한 장미로는 페피타, 러블리 블루, 콘페티, 그랜드 가라, 차밍, 비탈, 로얄을 포함한 몇 가지 종으로 먼저 장미에서 (표 10) petiole을 분리하여 멸균한 후 외래유전자를 갖고 있는 *Agrobacterium*과 7일간의 공조배양 후 MS salts, vitamine, 5mg/l의 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid), 30g/l의 sucrose, 300mg/l의 L-proline과 4g/l의 agarose, pH 5.8로 구성된 preculture medium에 100mg/l의 kanamycin과 500mg/l의 carbenicillin의 항생제를 포함한 선택배지에 치상하고 밝은 곳에서 배양하여 유전자 형질전환 여부 및 신초 형성정도를 관찰하였다. 조직에 형질전환 시킨 후 신초 형성률이 높은 로즈유미의 경우 오히려 petiole에 형질전환을 시키게 되면 형질전환률

이 현저히 낮을 뿐만 아니라 형성된 callus가 배발생 callus보다는 비배발생 callus로서 형질전환하기 위한 재료로는 볼 수 없었다. 따라서 이러한 방법으로 형질전환을 유도하는 것은 매우 어려운 것으로 판단되어 형질전환에 더 이상 사용하지 않았다.

표 10. 장미 기관 중 petiole을 형질전환에 사용

종류	형질전환 시키기 전 개수	형질전환 시킨 후 개수
페피타	100	
로즈유미	122	이중에서 로즈유미와 카디날의 경우만 약 6주정도 petiole에서 형성된 callus가 잘 형성이 되다가 7주정도 되면서부터 callus의 성장률이 현저히 떨어지는 것을 확인하였다.
러블리블루	100	
차밍	95	
비탈	150	
카디날	134	
노블레스	114	

② Somatic embryo callus에 *Agrobacterium* 도입

기존 연구를 조사한 바에 따르면 장미 형질전환에 가장 효율적인 방법으로는 somatic embryo를 유도한 후 *Agrobacterium*을 감염시키는 것이라고 판단하였다. 따라서 신초가 가장 잘 형성되는 로즈유미를 이용하여 somatic embryo를 유도한 후 callus에 직접 감염시킨 후 형질전환 여부를 측정하였다. Somatic embryo 형성이 가장 높은 로즈유미의 callus에 외래유전자를 갖고 있는 *Agrobacterium*과 3일간의 공조 배양 후 1/2MS salts, 0.4mg/l의 thiamine HCl, 6g/l의 myo-inositol, 30g/l의 sucrose, 0.2mg/l NAA, 2mg/l BA, 4g/l agarose, pH 5.8로 구성된 culture medium에 200mg/l의 kanamycin과 500mg/l의 cefotaxime의 항생제를 포함한 선택배지에 치상하여 밝은 곳에서 배양하였다.

배양중 에 *Agrobacterium*을 제거하기 위한 한 가지 방법으로서 carbenicillin외에도 cefotaxime을 첨가함으로써 *Agrobacterium*을 깨끗하게 제거하여 형질전환 된 장미 조직의 선별을 수행하였다(그림 53과 그림 54). 그러나 형질전환 시킨 callus는 형질전환

시킨 후 약 4주 정도 잘 유지가 되다가 그림 53의 A, B와 C의 경우 callus가 형성이 되기 시작함과 동시에 장미의 조직이 형성이 되는 경우에는 어느 정도 shooting이 유도되다가 죽음에 이르거나 D, E와 같이 callus가 형성이 되는 경우가 있었지만 그림 54에서 보는 바와 같이 callus가 형질전환 시킨 후 약 8주정도 경과한 후 새로운 조직이 나오질 못하고 죽는 것으로 보아 형질전환을 성공할 수 없었다. 즉, callus에서 shooting이 유도되기 힘들거나 shooting이 유도되기 전에 비배발생 callus로 전환되어 형질전환 된 장미를 선별할 수 없었다.

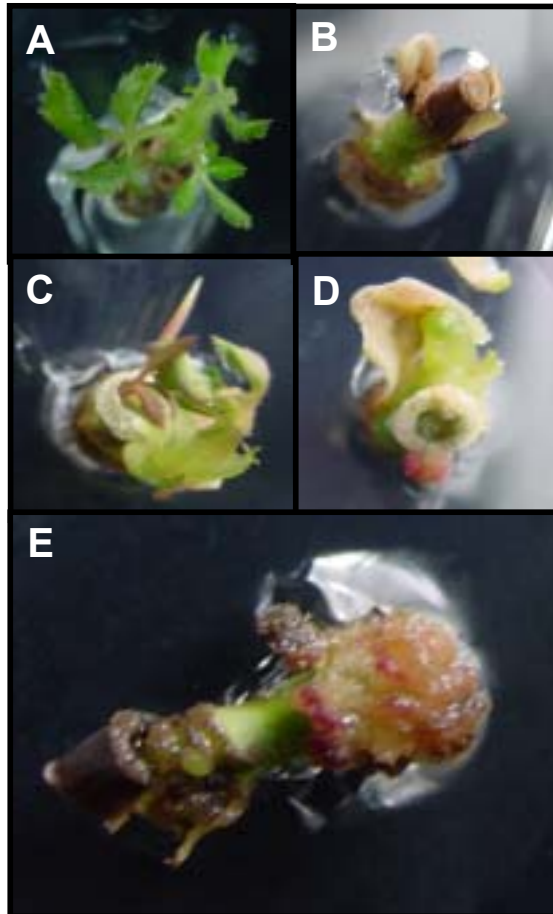


그림 53. 형질전환 시킨 후 4주경과 한 로즈유미의 somatic embryo callus

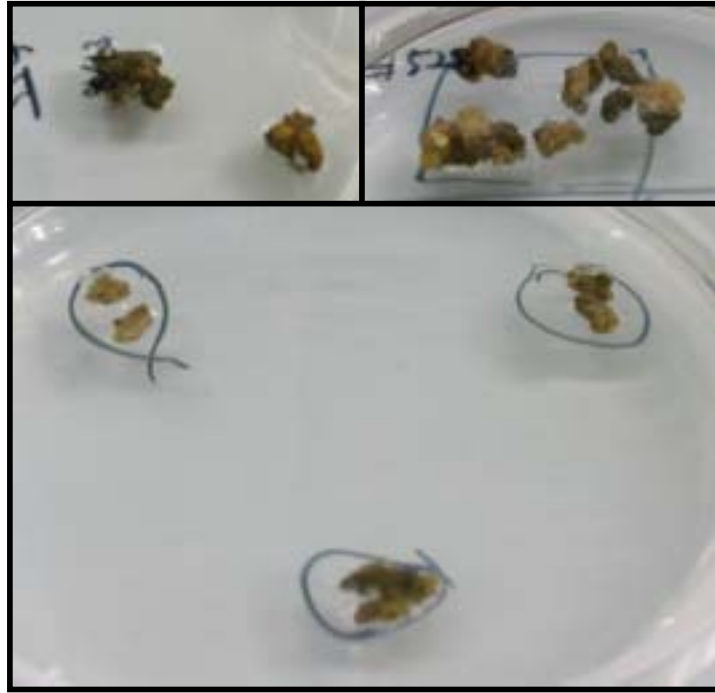


그림 54. 형질전환 시킨 후 8주경과 한 로즈유미의 somatic embryo callus

(2) Peptide를 이용한 형질전환

Cationic peptide를 이용한 형질전환은 그림 55에 나타난 모식도에 따라 형질전환 되는 것으로 추정하고 있다. 이 방법은 핵으로 DNA를 직접 운반하기 때문에 여러 다른 DNA delivery method들이 직접적으로 nucleus로 targeting 할 수 없다는 사실과 비교해 볼 때 이렇게 높은 efficiency는 이들 oligopeptide의 nucleus localization property에 의한 것으로 추정할 수 있다.

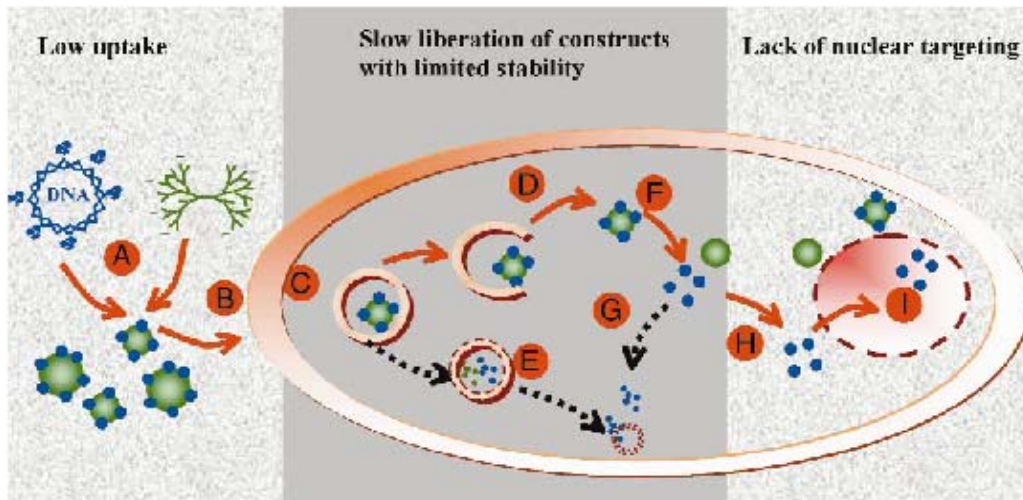


그림 55. Peptide에 의한 DNA delivery의 pathway

(A) DAN와 복합체 형성 (B) 전달 (C) Endocytosis (D) endosome으로부터 방출 (E) Degradation (edosome) (F) 세포내로 전달 (G) Degradation (cytosol) (H) Nuclear targeting. (I) Nuclear entry and expression.

따라서 본 연구는 성균관대학교의 이우성 교수님 연구팀에서 peptide에 의해 원하는 plant cell 혹은 tissue로 DNA의 delivery가 가능하다는 것을 밝히고자 하였다. 이를 위하여 이우성 교수님 연구실에서 진행된 DNA delivery 시스템을 이용하였다. 앞선 예비실험을 바탕으로 장미 조직과 somatic embryo를 이용하여 형질전환을 시도하였다.

(가) Somatic embryo의 형질전환

장미 조직은 로즈유미를 사용하고 somatic embryo는 심파스를 이용하였다. PBS 200 μ l에 DNA와 peptide를 각각 2 ng씩 첨가하여 ice에서 1시간 동안complex를 형성하도록 incubation 하였다. 그리고 나서 각각 조직과 callus에 침투하도록 dark상태에서 25 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 shaking한 후 항생제가 포함되지 않은 MS배지에서 3일간 안정화시켰다. 3일 후 200 mg/l의 kanamycin이 첨가된 MS배지에 치상하여 2주마다 계대배양 하면서 관찰하였다.

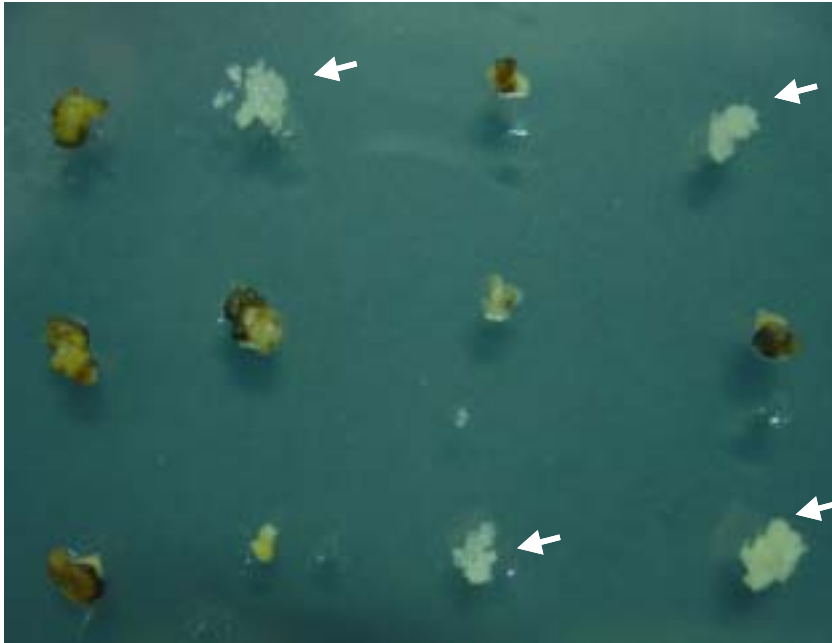


그림 56. *Agrobacterium*과 peptide를 이용한 심파스의 somatic embryo에 형질전환시킨 후 selection medium에서 8주경과 (화살표로 표시된 callus를 제외한 것만 선별하여 shooting유도)

각각 *Agrobacterium*과 peptide를 이용하여 형질전환 후 항생제가 적당히 포함된 배지에서 2주 간격으로 계대배양하면서 관찰 후 8주정도 경과한 상태의 callus이다(그림 56). 화살표로 표시된 callus의 상태는 비배발생 callus로서 shooting이 유도되지 않을 조직이며 나머지 callus는 약간씩 새로운 callus의 조직이 생겨나오는 것을 확인하였다. 따라서 외부 DNA가 callus에 들어간 것으로 추정된다. 그러나 shooting selection배지에 옮겨 장미의 shooting을 유도는 할 수 없었다.

(나) 장미의 조직을 이용한 형질전환

Peptide를 DNA와 binding하여 somatic embryo에서 비록 식물체를 유도하지는 못했지만 외부 DNA를 callus에 운반하는 데는 성공하였기 때문에 regeneration이 필요 없는 장미의 조직에 직접 형질전환 시켰다. 그림 57은 처리 후 약 6주 정도 경과한 상태를 나타낸 것이다. Shooting 유도능력이 좋은 로즈유미를 사용하였으며 plate상에서 화살표로 표시된 조직이 가장 싱싱하게 어느 정도 새로운 조직들이 생겨나고 있

었다. 그러나 형질전환 shooing배지로 옮겨 완전한 식물체를 유도하려고 하였으나 약 9주정도 지나서 조직의 바깥부분부터 갈색으로 변하여 죽는 것을 확인 할 수 있었다.

오른쪽에 있는 그림은 확대하여 보여준 사진으로 200mg/l의 kanamycin이 첨가된 배지에서 어느 정도 적응 능력을 보여주었으나 역시 약 9주정도 지나면서부터 조직이 갈색으로 변하여 죽는 것을 확인할 수 있었으며 (그림 58) 형질전환 장미를 얻을 수 없었다.



그림 57. Peptide를 이용하여 형질전환 시켜 6주정도 경과한 로즈유미
화살표 : 형질전환 된 것으로 판단되는 장미의 조직
우 : 확대한 사진

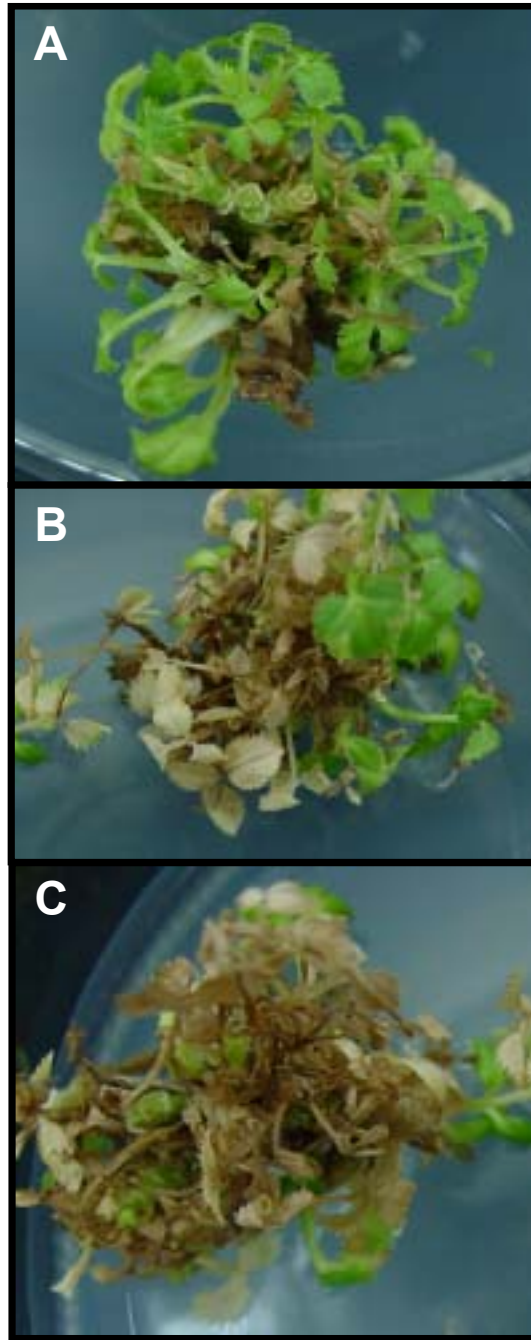


그림 58. Peptide를 이용한 로즈유미의 조직에 형질전환 시킨 후 selection medium에서 9주경과

(3) 형질전환 방법 확립 과정

장미의 형질전환은 매우 어려운 것으로 잘 알려져 있다. 따라서 본 연구에서 형질 전환을 위하여 총 23개의 품종을 사용하여, 형질전환에 최적의 장미를 스크린 하고자 하였다. 본 연구결과 로즈유미가 가장 최적의 장미 품종으로 확인되었다.

표 11. 장미를 이용한 형질전환 체계를 갖추기 위한 회의

날짜	장소	목적
2003. 3.13	대전생명과학연구소 (유장렬 박사)	장미 형질전환에 관한 실험 토의
2003. 4. 4	대전생명공학연구원 (유장렬 박사)	장미 embryo를 이용한 형질전환에 관한 실험 workshop
2003. 7. 4	대전생명과학연구소 (유장렬박사)	장미의 SAMDC유전자를 이용한 형질전환 방법 중 문제점에 관한 토의
2003. 8.19	성균관대학교 (이우성 박사)	SAMDC유전자를 이용한 형질전환 방법 중 peptide를 이용한 방법에 관한 workshop
2004. 1. 5	고려대학교 (김경현 박사)	SAMDC유전자를 이용하여 장미의 형질전환 응용방법 토의
2004. 4. 14	전남농업기술원 (이재신 연구원)	장미의 미분화조직에서 somatic embryo callus를 유도한 후 shooting 재분화 system에 관한 토의 및 workshop
2004. 4. 16	전남농업기술원 (이재신 연구원)	장미의 somatic embryo callus induction 조건 토의 및 workshop
2004. 4. 22	전남농업기술원 (이재신 연구원)	유도된 장미의 somatic embryo callus를 계대배양하기 위한 조건 토의
2004. 4. 28	전남농업기술원 (이재신 연구원)	유도된 장미의 somatic embryo callus에서 shooting조건을 잡기위한 실험 workshop
2004. 6. 22	전남농업기술원 (기광연 연구원)	Somatic embryo callus에 agrobacterium 감염 시키고 shooting을 유도하기 위한 호르몬 및 배지 조성 확립
2004. 6. 30	호남대학교 (고갑천 교수)	장미조직을 이용한 형질전환에서 새로운 shooting을 induction하기 위한 조건

표 12. 장미를 이용한 형질전환 실험

실험날짜	실험방법	조직(개)	증상 및 결과
2001년 11월	형질전환매체 : <i>Agrobacterium</i> 목적 : 감염 시간영향 분석 30초간 감염시킨 후 치상	500	<i>Agrobacterium</i> 을 이용하여 형질전환시킨 후 약 2주까지 <i>Agrobacterium</i> 이 너무 많이 자라 이로 인해 장미 조직이 성장하는데 있어서 영향을 미침
2002년 1월	형질전환매체 : <i>Agrobacterium</i> 목적 : 감염 시간에 따른 조직 영향 분석	682	상태가 매우 양호하다가 약 2주가 경과한 후 조직이 전체적으로 암갈색으로 변화하여 괴사함
2002년 3월	형질전환매체 : <i>Agrobacterium</i> 목적 : 감염 시간의 조직 영향 분석 및 조직 변화 관찰	561	조직에 전반적으로 <i>Agrobacterium</i> 이 너무 많이 자라나와 조직의 성장에 오히려 좋지않은 영향을 미치는 것으로 보이며 생장이 매우 느리게 진행이 되다가 괴사
2002년 5월	형질전환매체 : <i>Agrobacterium</i> 목적 : wounding에 영향에 의한 감염영향과 조직 영향 분석 및 조직 변화 관찰	713	<i>Agrobacterium</i> 을 제거하기 위한 하나의 방법으로 carbenicillin을 사용하였는데 <i>Agrobacterium</i> 이 제거되지 않아 생장이 전반적으로 매우 느리게 진행되는 것을 확인
2002년 7월	형질전환매체 : <i>Agrobacterium</i> 목적 : wounding에 도구(바늘)에 따른 감염 영향과 조직 영향 분석 및 조직 변화 관찰	500	<i>Agrobacterium</i> 을 제거하기 위한 하나의 방법으로 carbenicillin대신 cefotaxime으로 변경하여 처리한 결과 <i>Agrobacterium</i> 은 제거가 되었으나 조직에서 전반적으로 백화현상이 일어남
2002년 9월	형질전환매체 : <i>Agrobacterium</i> 목적 : wounding에 도구(바늘)에 따른 감염영향과 조직 영향 분석 및 조직 변화 관찰로 장미의 조직과 함께 somatic embryo callus를 이용	698	Kanamycin selection과정 중 kanamycin의 농도가 너무 낮아 (75 μ g/ml)selection하는 도중 식물체가 전반적으로 백화현상이 일어남

2002년 11월	<p>형질전환매체 : <i>Agrobacterium</i> 목적 : wounding에 도구(바늘)에 따른 감염영향과 조직 영향 분석 및 조직 변화 관찰로 장미의 조직과 함께 somatic embryo callus를 이용, 감염시간조정</p>	500	<p>Kanamycin selection과정 중 kanamycin의 농도를 높였으나 (100μg/ml)selection하는 도중 약 6주 후식물체가 암갈색으로 변하여 괴사</p>
2003년 1월	<p>형질전환매체 : <i>Agrobacterium</i> 목적 : wounding에 도구(바늘)에 따른 감염영향과 조직 영향 분석 및 조직 변화 관찰로 장미의 조직과 함께 somatic embryo callus 이용, wounding 시간 조정</p>	550	<p>조직과 callus모두 성장속도가 너무 느리거나 생장에 있어서 변화를 보이지 않음</p>
2003년 3월	<p>형질전환매체 : <i>Agrobacterium</i> 목적 : wounding에 도구(바늘)에 따른 감염영향과 조직 영향 분석 및 조직 변화 관찰로 장미의 조직과 함께 somatic embryo callus를 이용, wounding 부위조정</p>	720	<p>조직과 callus모두 성장속도가 너무 느렸으며 callus에서 형질전환 된 것으로 사료되어지는 조직이 분화되었으나 shooting이 나오지 못하고 괴사</p>
2003년 5월	<p>형질전환매체 : <i>Agrobacterium</i> 목적 : wounding에 도구(바늘)에 따른 감염영향과 조직 영향 분석 및 조직 변화 관찰로 장미의 조직과 함께 somatic embryo callus를 이용, <i>Agrobacterium</i> 농도조정</p>	690	<p>조직과 callus모두 성장속도가 너무 완만하였으며 callus에서 형질전환 된 것으로 사료되어지는 조직이 분화되었다. 그러나 호르몬의 조성을 달리하여 shooting을 유도하려 하였으나 형질전환 된 장미의 재분화가 이루어지지 않음</p>
2003년 6월	<p>형질전환매체 : <i>Agrobacterium</i> 목적 : wounding에 도구(바늘)에 따른 감염영향과 somatic embryo callus를 이용</p>	480	<p>감염시킨 somatic embryo callus에서 형질전환 된것으로 사료되어지는 shooting이 유도되었으나 이는 곧 3주이내로 조직에서 백화현상이 일어나 성공하지 못함</p>

2003년 7월	형질전환매체 : Peptide 목적 : peptide와 DNA를 binding 조건 확립, 조직과 약 1시간정도 incubation	716	감염시킨 somatic embryo callus에서 형질전환 된것으로 사료되어지는 shooting이 유도되어 호르몬의 조성을 달리하여 배양하였음에도 불구하고 더 이상의 생장을 하지 못하고 괴사
2003년 9월	형질전환매체 : Peptide 목적 : peptide와 DNA를 binding 조건 확립, DNA 및 peptide 농도 조정, 조직과 약 1시간정도 incubation	630	Peptide를 이용하여 형질전환 시킬 경우 가장 문제점인 DNA와 peptide의 binding하는 농도의 중요성 확인
2003년 10월	형질전환매체 : Peptide 목적 : peptide와 DNA를 binding 조건 확립, DNA 및 peptide 농도 조정, somatic embryo callus와 약 1시간정도 incubation 시킴	520	Peptide 형질전환을 위한 이용하여 peptide 및 DNA 적정 농도를 구하여 형질전환시켰으나 shooting을 유도되지 않음. 형성된 somatic embryo callus가 비배발생 callus로 판단됨
2003년 11월	형질전환매체 : Peptide 목적 : peptide와 DNA를 binding 조건 확립, DNA 및 peptide 농도 조정, somatic embryo callus 성장시기별 영향	490	오염원을 제거하고 형질전환에 시도하여 배양 중 조직이 전반적으로 갈색으로 변하며 호물호물해져서 괴사
2004년 1월	형질전환매체 : Peptide 목적 : peptide와 DNA를 binding 조건 확립, DNA 및 peptide 농도 조정, somatic embryo callus 성장시기별 영향	745	배양시키는 시간을 좀 더 짧게 하여 시도하여 조직을 얻었으나 이는 형질전환이 되지 않은 wild-type과 같은 상태의 조직으로 판명됨
2004년 3월	형질전환매체: <i>Agrobacterium</i> 과 Peptide를 동시에 이용 목적 : 조직과 somatic embryo callus에 날카로운 핀으로 wound를 준 후 약 3분간 감염시킨 후 치상하되 장미의 조직과 somatic embryo callus를 이용	636	Somatic embryo callus에서 새로운 조직이 형성됨 그러나 비배발생 callus가 유도됨으로써 shooting이유도되지 않았음

2004년 5월	형질전환매체: <i>Agrobacterium</i> 과 Peptide를 동시에 이용 목적 : 신초와 somatic embryo callus에 날카로운 핀으로 wound를 준 후 약 3분간 감염시킨 후 치상하되 장미의 조직과 somatic embryo callus를 이용	560	조직과 callus모두 성장속도가 매우 저하되었고, callus에서 형질전환 된 것으로 사료되어지는 조직이 분화되었으나 shooting이 유도되지 않고 괴사
2004년 7월	형질전환매체: <i>Agrobacterium</i> 과 Peptide를 동시에 이용 목적 : 신초와 somatic embryo callus에 날카로운 핀으로 wound를 준 후 약 3분간 감염시킨 후 치상하되 장미의 조직과 somatic embryo callus를 이용	480	조직과 callus모두 성장속도가 너무 둔화되었으며, 조직과 callus에서 형질전환 된 것으로 사료되어지는 조직이 분화되었음 그러나 selection 과정 중 약 9주가 경과한 후 모두 암갈색상태로 변함

또한 기존의 장미의 형질전환의 기술을 확보하고 있는 실험실을 방문하여 상호 기술 교류 등을 실시하며 자문을 얻는 방법으로 연구를 진행하였다. 본 연구팀이 방문한 실험실은 대전생명과학연구소 유장렬 박사 연구팀과 성균관대학교 이우성 교수님 연구팀, 그리고 호남대학교 고갑천 교수님팀 및 전남농업기술원의 이재신 연구원을 방문하여 각각 장미 형질전환에 필요한 장미시료와 형질 전환하는 방법을 확립을 위한 교류 및 workshop을 실시하였다 (표 11).

이에 따라서 장미의 신초조직과 somatic embryo callus를 유도한 후 형질전환을 본 연구 기간 중 여러 차례 시도하였고, 그 결과를 표 12에 요약 정리하여 나타내었다. 본 연구팀에서 수행한 방법은 신초 및 somatic embryo callus를 재료로 하여 *Agrobacterium*과 peptide를 이용하여 형질전환하는 방법을 사용하였다.

다. 장미의 화질 및 신선도 유지에 대한 폴리아민의 생리적 역할 규명

1) Ethylene 생성량 분석

폴리아민은 생장조절물질이면서 동시에 다가양이온의 물리적 성질로 인하여 세포막과 핵산 및 단백질을 안정화시킨다. 특히 폴리아민은 에틸렌의 생합성을 억제시킴으로써 노화를 지연시키는 것으로 알려져 있는데, 에틸렌은 꽃의 신선도와 화질에 영향을 준다. 따라서 장미 절화에 1mM의 putrescine, spermidine, spermine 등의 폴리아민을 각각 처리한 다음 에틸렌 생합성량을 조사함으로써 장미의 꽃의 화질 및 신선도를 유지와 에틸렌 생합성의 연관성을 파악하였다. 절화장미를 실험대상은 국내 시장에서 상품성이 뛰어나 거래량이 많은 카디날(그림 59)과 비탈 (그림 60) 품종으로 하였다.

카디날과 비탈 모두의 품종에서 절화장미는 절화 후 5일까지 에틸렌 생성은 커다란 변화를 보이지 않았다. 그러나 6일째에 에틸렌 생합성량이 급격히 증가하여 절화 초기에 비해 약 5배 정도 증가하였다. 이러한 현상은 climacteric 양상을 나타내는 것으로 추정되었다. 1mM의 폴리아민은 6일째 발생하는 에틸렌의 급격한 증가를 억제하였는데, spermine이 가장 좋은 효과를 나타내었다.

2) SAMDC 활성 분석

1980년대 이래로 폴리아민과 에틸렌은 상호 길항작용의 가능성이 제안되어 왔다. 이러한 가설에 의하면 에틸렌 합성증가는 폴리아민의 감소를 유도하여야 한다. 따라서 절화 후 배양기간 동안 꽃의 폴리아민의 함량 감소가 예상된다. 이를 확인하기 위하여 우선 폴리아민 합성의 중요한 효소중의 하나인 SAMDC의 활성을 조사하였다. 절화장미에서 카디날과 비탈의 두 품종 모두의 꽃과 잎에서 절화 후 배양기간 동안 SAMDC의 효소활성은 절화 초기에 다소 높은 수준을 유지했다가 배양시간이 증가하면서 일차적으로 활성이 다소 감소하였다. 그러나 배양 5일후 SAMDC의 활성은 다시 증가하는 양상을 보였다 (그림 61, 62, 63, 64). 노화 조직 또는 절화조직의 polyamine은 일반적으로 감소하는 경향을 보인다. 본 연구에서도 초기에는 polyamine 합성효소인 SAMDC가 감소하였다. 그러나 배양 중기 이후 SAMDC 증가한 것은 노화의 영향 외에 다른 가능성을 배제할 수 없다. 특히 spermine을 처리한 경우 배양기간동안

SAMDC의 활성이 감소하는 것으로 나타났다. Spermine은 다른 폴리아민과 달리 감염에 의하여 급격히 증가하는 것으로 병해 저항성을 보이는 물질로 알려져 있다. 5일 이후 SAMDC의 활성이 증가한 것은 배양중 감염에 의해서 나타나는 현상일 가능성을 배제할 수 없다.

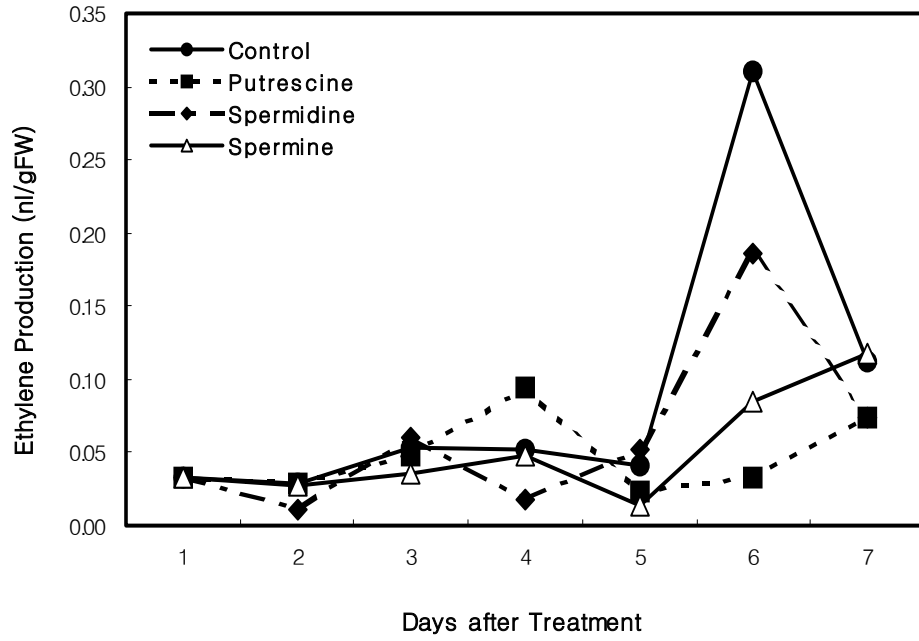


그림 59. 카디날 절화장미에서의 에틸렌 생합성 및 폴리아민의 영향

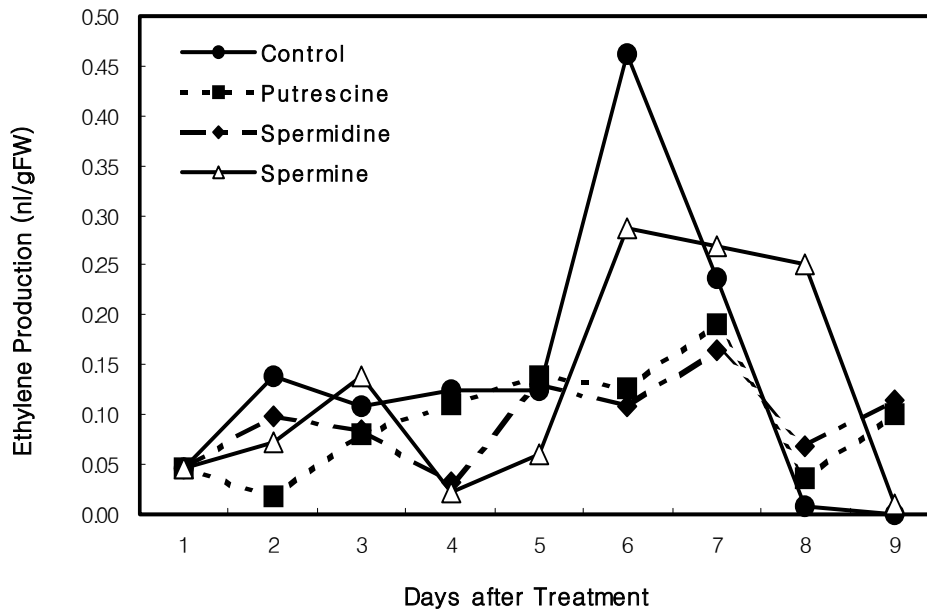


그림 60. 비탈 절화장미에서의 에틸렌 생합성 및 폴리아민의 영향

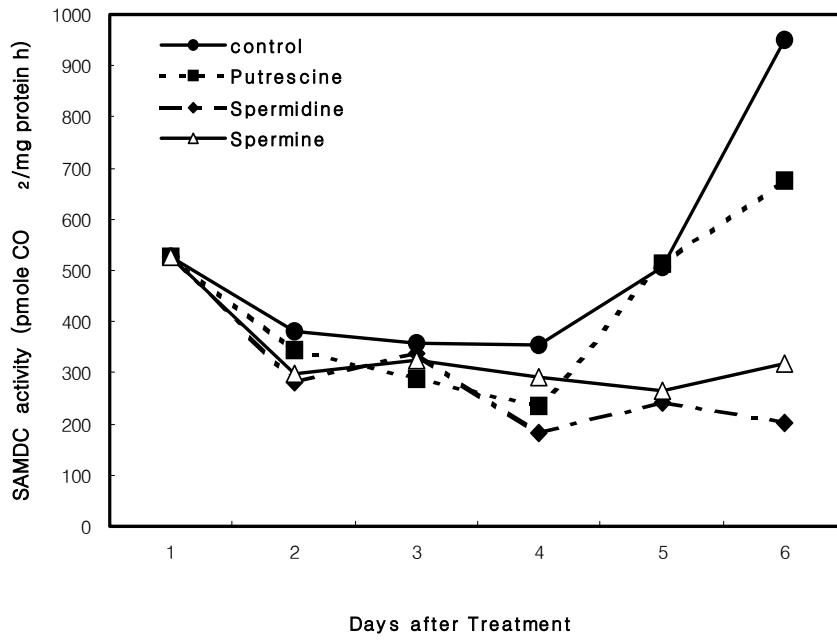


그림 61. 노화되는 카디날 꽃에서의 SAMDC 활성 및 폴리아민의 영향

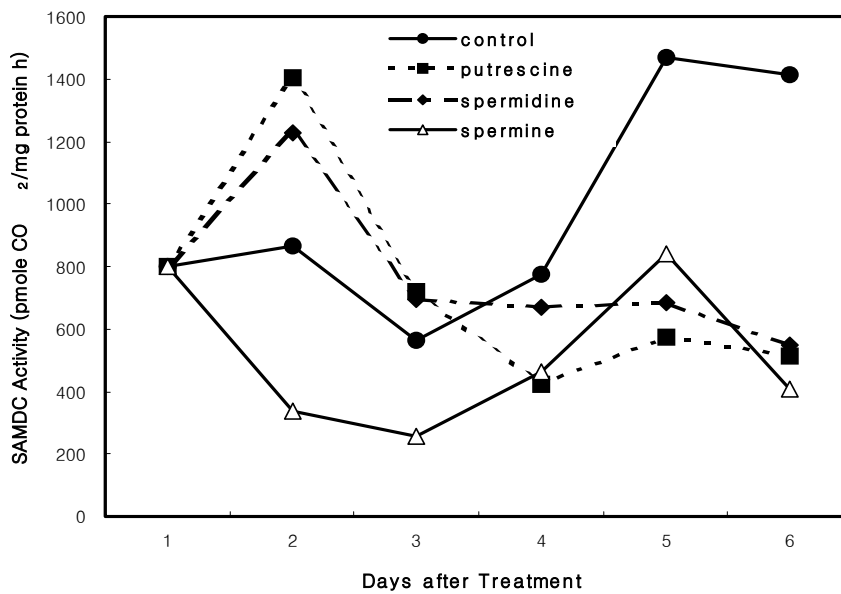


그림 62. 노화되는 카디날 잎에서의 SAMDC 활성 및 폴리아민의 영향

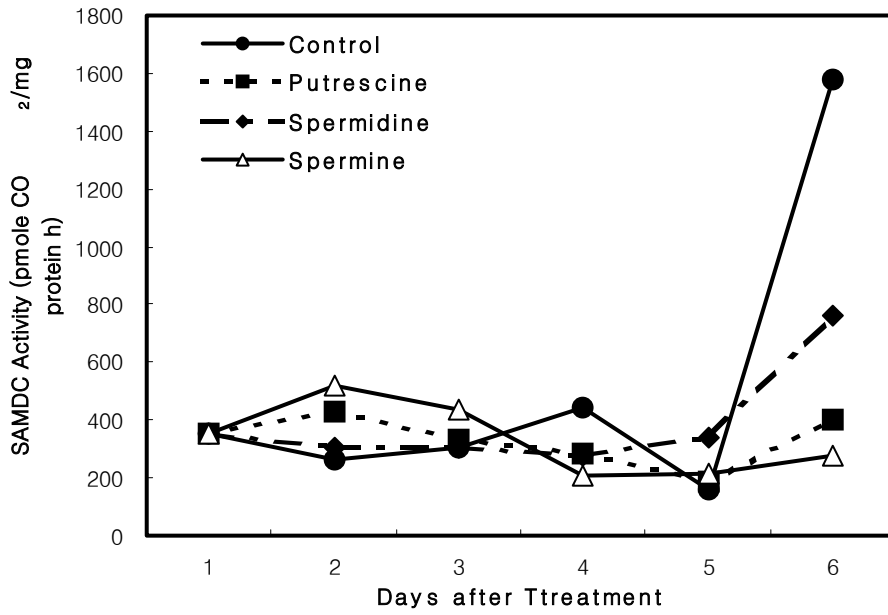


그림 63. 노화되는 비탈 꽃에서의 SAMDC 활성 및 폴리아민의 영향

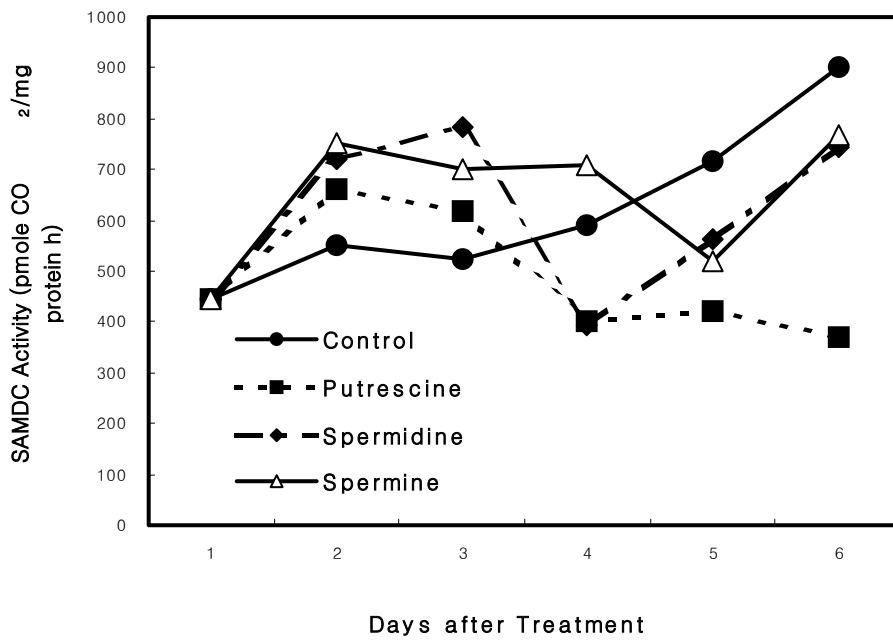


그림 64. 노화되는 비탈 잎에서의 SAMDC 활성 및 폴리아민의 영향

3) 호르몬에 따른 장미의 신선도 및 화질

상기 형질전환기술개발연구에서 가장 좋은 품종이 로즈유미로 나타났기 때문에 로즈유미에 대한 추가 분석을 실시하였다. 또한 상기 연구에서 장미의 신선도 또는 화질과 에틸렌과 폴리아민이 밀접한 연관성을 확인할 수 없었다. 그러나 멸균하지 않은 상태에서 절화를 방치하기 때문에 세균 감염의 영향을 배제하기 어렵다고 판단되어 식물체 중 물에 잠기는 부분을 멸균하여 조사하였다. 폴리아민을 합성하는 대표적인 효소인 SAMDC의 프로모터에는 여러 가지 호르몬에 의해서 조절되는 것으로 알려진 element들을 함유하고 있다는 것을 본 실험실에서 보고한 바 있다. 따라서 SAMDC의 발현 양상 및 폴리아민 함량도 함께 조사하였다.

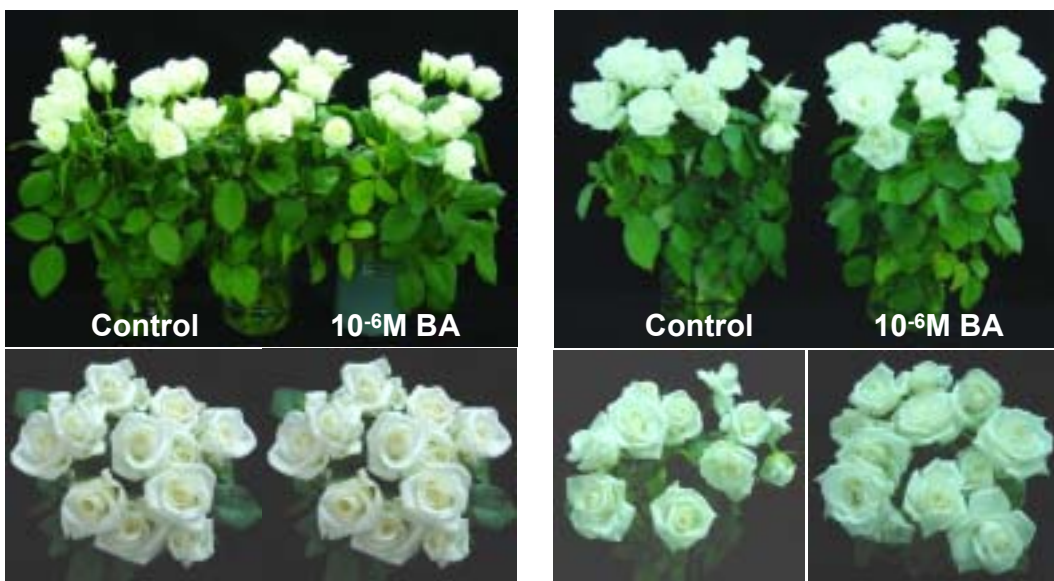


그림 65. 호르몬 BA를 처리 한 후 장미의 화질 및 신선도 비교

왼쪽: BA를 처리 한 후 0day

오른쪽: BA를 처리 한 후 6day

그림 65는 장미의 화질 및 신선도를 비교하기 위해 호르몬의 영향중 BA의 영향을 나타낸 것이다. 이 실험을 위해서 BA, 2,4-D, SA, GA, ABA, AgNO₃등을 각각 농도 별로 처리하였고, 가장 신선도 개선에 영향을 주는 호르몬은 BA였다. 또한 2,4-D의 경우 오히려 에틸렌을 유도하여 꽃이 빨리 시들어 버리는 것을 확인 할 수 있었다.

이는 auxin에 의하여 유도되는 ethylene이 꽃의 노화를 촉진하기 때문으로 생각된다. 그러나 기타의 호르몬은 절화의 신선도 등에 특별한 영향을 나타내지 않았다. 이러한 연구 결과는 ethylene의 합성을 억제해 꽃의 신선도 유지에 효과적으로 이용될 수 있다는 것을 의미한다. 또한 ethylene의 길항작용으로 알려진 polyamine도 여전히 유용하게 사용될 수 있다는 것을 암시한다고 할 수 있다.

상기 실험에서 BA가 절화의 신선도를 유지하는데 가장 효과적인 것으로 나타났고, polyamine은 노화를 억제하는 것으로 알려져 있기 때문에 신선도 유지가 polyamine과 연관성을 가지고 있는지를 파악하고자 하였다. 이를 위하여 절화의 꽃잎과 잎에서 polyamine의 함량과 SAMDC의 활성에 미치는 BA의 영향을 조사하였다. 그림 66, 67에 나타난 바와 같이 대조구에서 SAMDC의 활성은 배양기간이 증가할수록 감소하였다.

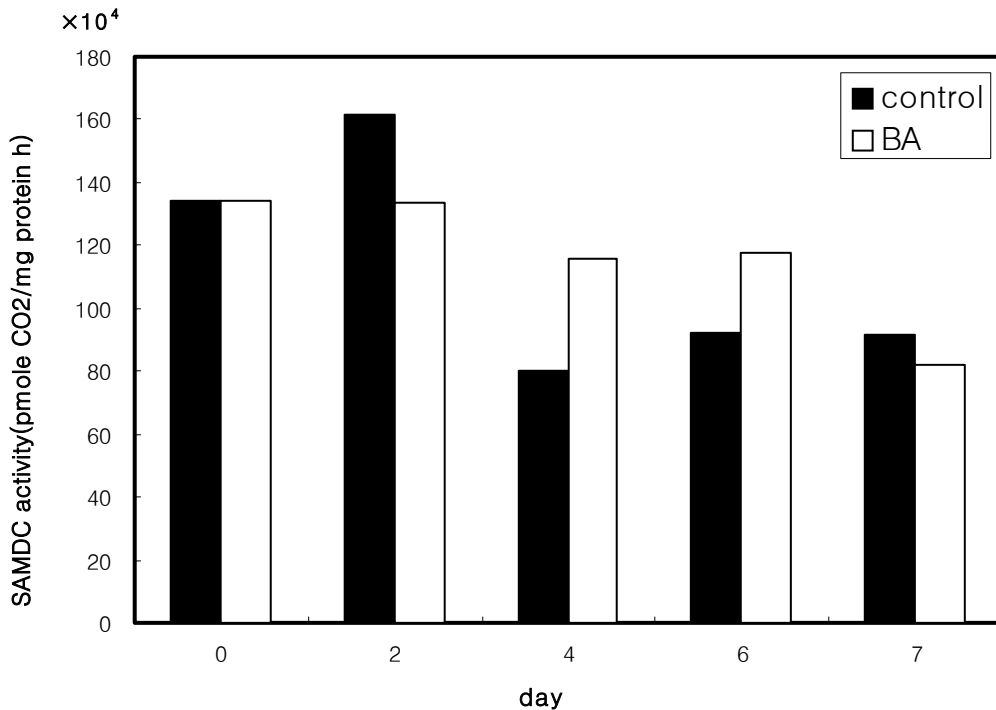


그림 66. 로즈유미에 BA를 처리한 후 꽃에서 SAMDC activity 측정

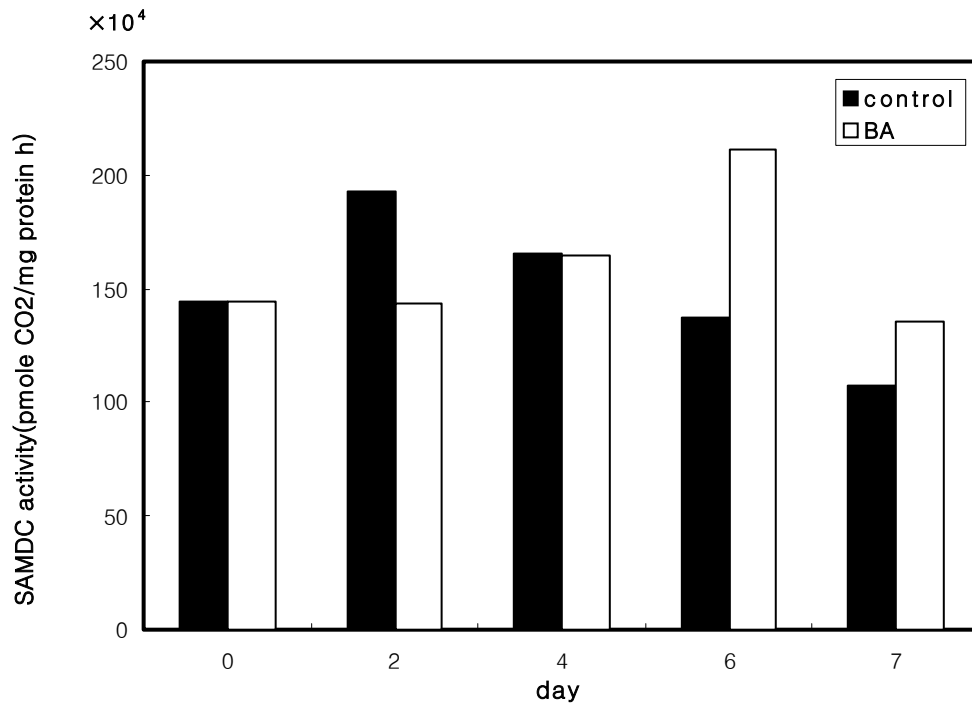
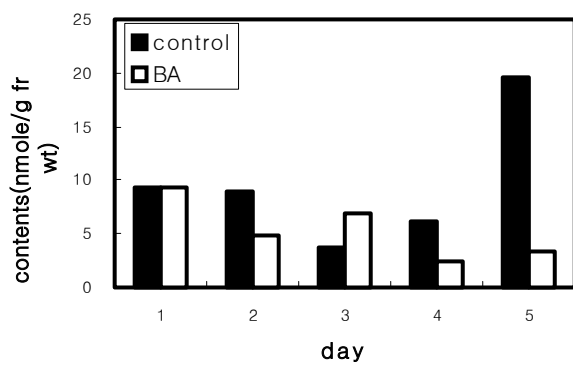
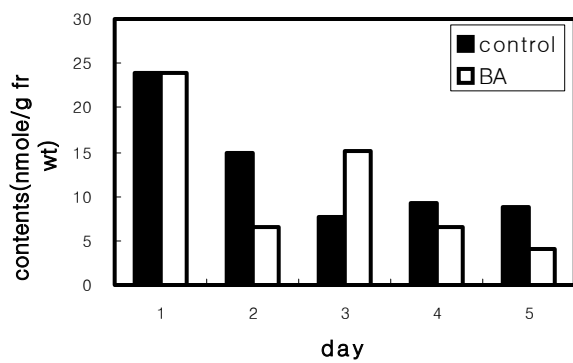
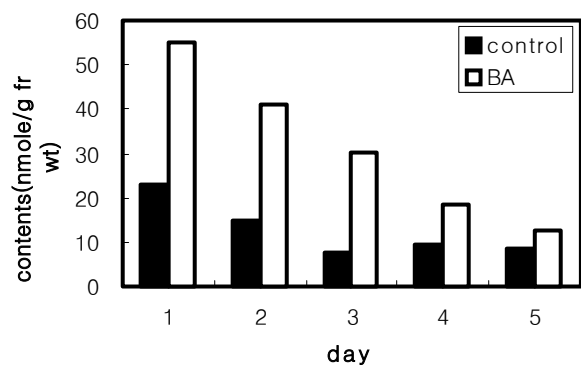


그림 67. 로즈유미에 BA를 처리한 후 잎에서 SAMDC activity 측정

이러한 결과는 카니날과 비탈에서 나타난 결과와 상이하지만 로즈유미으로 실험을 할 경우 절화가 물에 잠기는 부분을 소독처리하여 감염을 최소화하였기 때문에 나타난 결과로 추정된다. 따라서 정상적인 절화의 꽃과 잎에서 SAMDC는 노화에 따라서 점차 감소되는 것으로 판단된다.

SAMDC의 활성 감소는 세포내 폴리아민의 함량에 영향을 줄 수 있기 때문에 세포내 폴리아민의 함량의 조사하였다. 그림 68은 절화의 꽃과 잎에서 putrescine, spermidin, 그리고 spermine의 함량을 나타낸 것이다. Putrescine의 경우 BA 처리에 의해서 다소 peak가 이동하는 양상의 보였으나 spermidine과 spermine에서는 뚜렷한 경향을 찾을 수 없었다. 장미의 절화수명에 있어서 폴리아민의 영향은 형질전환체가 개발되면 확인이 가능할 것으로 판단되며, 이에 대한 연구가 진행 중이다.

A.



B.

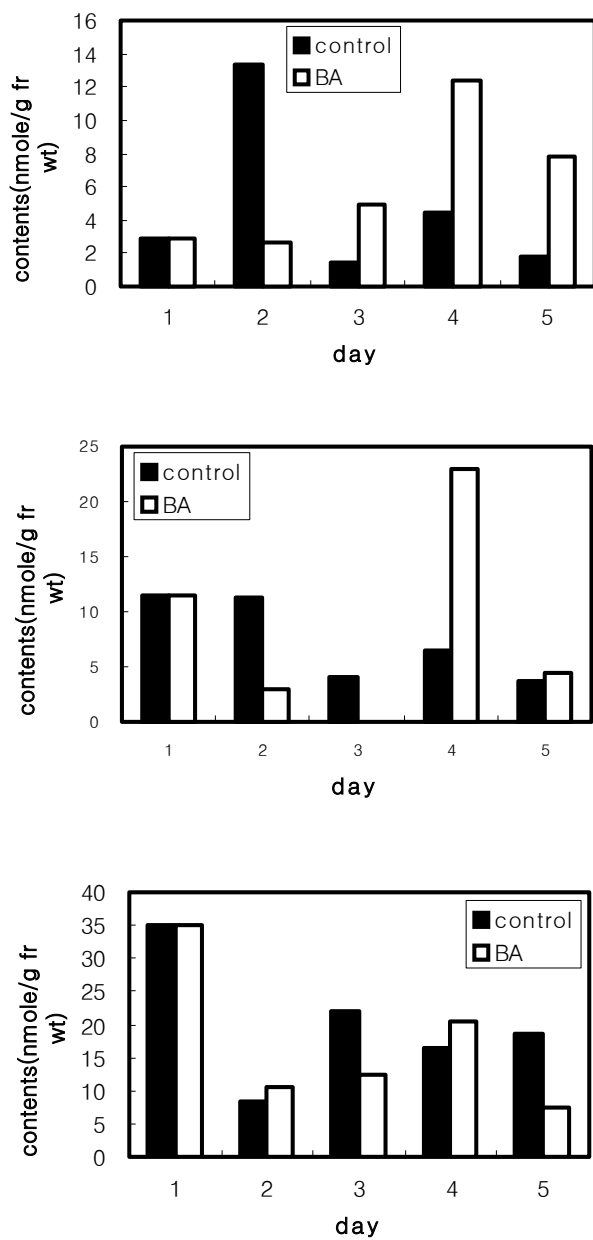


그림 68. 로즈유미에 BA를 처리한 후 꽃과 잎에서 폴리아민 정량
 A. 꽃에서 putrescine(위), spermidine(가운데), spermine(아래)정량
 B. 잎에서 putrescine(위), spermidine(가운데), spermine(아래)정량

라. 적요

본 연구에서는 카네이션 SAMDC uORF 및 SAMDC 유전자를 포함하고 있는 Construct I을 장미에 형질전환시켜 SAMDC 과다발현 식물체를 제조하고자 하였다. 따라서 SAMDC의 cDNA 중에서 5'-UTR에 54개의 아미노산으로 이루어진 *CSDC9*의 uORF를 이용하여 uORF의 활성 및 기능을 분석하였다.

SAMDC uORF는 translational inhibitor로 작용하며 uORF가 downstream에 있는 main ORF의 translation을 억제하는데 있어서 uORF의 translation 여부와 아미노산의 서열이 중요한 억제효과를 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 SAMDC uORF의 염기서열에 돌연변이를 유발한 point-mutated construct를 이용하여 downstream ORF인 *GUS*의 steady-state level이 변화되는 것을 확인하였다. 정상적인 uORF를 가지는 경우 downstream에 존재하는 *GUS* mRNA의 stability가 크게 저하되었으며 uORF가 downstream *GUS*의 transcription 단계에 영향을 미쳐 transcription 속도를 감소시키는 것도 확인할 수 있었다. 한편 SAMDC 효소의 최종산물인 폴리아민이 uORF의 작용에 미치는 영향을 알아보기 위해서 *in vitro* TNT반응을 실시한 것은 폴리아민에 의해서 *GUS*의 효소 활성 및 단백질 합성이 억제되었다. 특히 uORF가 translation 뿐만 아니라 transcription에도 영향을 주었기에 세포 내에서 조절되는 uORF의 작용을 좀더 살펴보기 위해서 transient expression assay 방법을 이용하였다. SAMDC uORF와 GFP fusion construct를 제조하여 subcellular localization을 확인한 결과 incubation 약 42시간 후에 green fluorescent signal이 세포질에서 선명하게 관찰되는 것을 확인하였다. 이것은 plant SAMDC uORF의 localization이 세포질이라는 것을 처음 밝히는 결과라고 생각된다. 그리고 SAMDC uORF protein의 구조 분석결과 putative한 phosphorylation site가 4개 존재하였기에 실제로 uORF protein이 phosphorylation 되는지를 *in vitro* phosphorylation assay를 수행해서 확인하였다. 또한 SAMDC uORF에 의해 일어나는 downstream ORF의 translation inhibition mechanism을 좀 더 깊이 살펴보기 위해서 primer extension inhibition (toeprint) assays를 실시한 결과 동물에서와 같은 ribosomal stalling 현상이 관찰되었고 이것뿐만 아니라 leaky scanning 현상도 관찰되었다.

현재 식물의 SAMDC uORF 단백질이 phosphorylation되어 transcription 또는 translation에 직접 혹은 간접적으로 영향을 주는지에 관한 연구 결과는 없는 상태이다. 따라서 본 연구에서는 정교하게 폴리아민 생합성 양을 조절하는 *CSDC9*의 uORF를 통

해서 식물뿐만 아니라 진핵생물 전반에 적용될 수 있는 uORF의 작용 mechanism을 확인한 것에 의의를 두고자 한다.

다음으로 본 연구를 통해서 첫째는 장미에서 callus를 유도하는 기술, 둘째 외부 DNA를 형질전환하는 기술, 셋째 형질전환된 callus에서 shoot을 유도하는 기술 마지막으로 shoot에서 root를 유도하여 식물체를 만드는 기술로 형질전환기술을 세분하여 각각의 기술을 동시에 개발하는 방법을 실시하였다.

상기의 연구 전략은 국내외적으로 아직 시도가 되지 않은 형질전환기술을 개발하는 방법론으로서 기술 전략별 연구 결과를 설명하면 다음과 같다. 네 번째 기술을 개발하기 위해서는 shoot이 필요하지만 callus에서 shoot을 유도할 수 있는 기술이 없는 상태에서 개발하는 것은 불가능하다. 그러나 본 연구에서는 이를 위하여 측아에서 신초를 만들어 식물체를 만드는 방법을 사용하여 성공함으로써, 획기적으로 연구에 필요한 시간을 단축할 수 있었다. 또한 신초는 조직에 직접 형질전환을 시도할 수 있기 때문에 외부 DNA를 형질전환하는 재료로 유용하게 사용할 수 있었다. 세 번째 기술은 아직까지 확립된 바 없는 기술로 알려져 있기 때문에, somatic embryo와 embryogenic callus에서 shoot를 유도하는 방법을 모두 사용하였다. Somatic embryo에서 shoot를 유도하는 것은 성공적이지 못하였으나, embryogenic callus에서 shoot를 유도하는 연구는 진행중이다. 두 번째 기술 개발을 위해서 *Agrobacterium*과 peptide를 이용하였다. 이 기술 개발은 somatic embryo 또는 embryogenic callus를 유도하는 기술이 개발된 후 이루어질 수 있었다. 본 연구팀에서 somatic embryo를 유도하는 기술이 먼저 개발되었기 때문에 이 재료를 이용하였고, 두 가지 접근방법 모두에서 형질전환에 성공하였다. 그리고 첫 번째 기술은 일반 캘러스, somatic embryo, 그리고 embryogenic callus로 나누어 시행하였고, 본 연구에서 이러한 캘러스를 개발하는 것은 모두 성공하였다.

이러한 식물체 형질전환 기술개발 방법론을 이용함으로써 매우 빠른 시간 내에 형질전환에 필요한 여러 관련기술을 획득할 수 있었다. 물론 분리한 기술 중 대부분이 성공하더라도 단지 하나의 기술이 성공적이지 않을 때 형질전환체를 얻지 못한다는 단점도 있었다. 본 연구에서도 일부 연구가 진행 중인 바 형질전환체를 확보하지 못하였다. 그럼에도 불구하고 연구가 진행 중인 기술을 제외한 관련 기술 모두를 개발할 수 있었다. 이러한 것은 본 연구에서 사용한 기술개발 전략이 기존의 순차적 진행을 하는 기존 연구방법론과 다른 병렬식 방법을 사용하였기 때문으로 판단된다. 따라

서 순차적 기술 개발 방식이 특정 단계에 문제가 발생할 경우 해당 단계 이후의 연구를 수행하지 못함으로써 관련 기술을 획득하지 못하는 단점을 극복할 수 있었다.

그리고 본 연구를 통하여 장미의 절화수명 또는 신선도와 polyamine의 관계를 명확히 밝히지 못했다. 그러나 ethylene이 장미의 절화수명을 단축시킨다는 것을 확인하였고, 세포 분열을 촉진하는 것으로 알려진 BA가 절화수명과 신선도를 증가시키는데 중요한 역할을 하고 있다는 결과를 얻었다. 일반적으로 세포분열을 촉진하면 polyamine의 합성이 증가하는 것으로 알려져 있다. 또한 polyamine은 ethylene과 길항작용을 할 수 있는 물질로 알려져 있는 바, polyamine이 절화수명과 신선도에 관련이 있을 것으로 판단된다. 따라서 SAMDC가 과량발현된 형질전환체가 개발되면 장미의 절화수명 및 신선도와 폴리아민의 관련성이 밝혀질 것으로 판단된다.

2. 제 2 세부과제

가. 형질전환 장미의 특성조사 및 실용화 기술개발

1) 형질전환용 장미 유전자원 특성조사 및 선발

장미 품종특성을 판단하는데 주요하다고 생각되는 항목을 UPOV 조사기준에 의해 화형, 화색, 초장, 화경, 꽃잎수, 향기, 가시, 흰가루병 발생정도 8개 항목을 조사 하였다.

보유 유전자원 중 수집종을 제외한 3년생 이상된 품종 가텐자바84 등 314종에 대한 특성조사 내역은 표 13 과 같다.

조사품종의 화형은 스탠다드가 261종, 스프레이가 53종이었으며 화색은 분홍이 88종, 적색이 60종, 노랑이 38종, 주홍 36종, 백 29종, 보라 6종, 주황 3종, 이중색 49종, 기타 7종이었다. 초장은 큰것(71cm이상) 레드산드라 등 34종이었으며 중간이 176종, 작은 것이 104종 이었다. 가시는 없는 것이 로얄드림 등 2종, 매우적은 것이 50종, 적은 것이 61종, 중간인 것이 134종, 많은 것이 39종, 매우 많은 것이 28종으로 분류되었다.

꽃잎수는 매우적은 것이 10종, 적은 것이 43종, 중간인 것이 121종, 많은 것이 83종, 매우많은 것이 57종이었고 화경은 큰 것이 48종, 중간이 97종, 작은 것이 155종, 매우작은 것이 10종 이었으며 향기는 매우 강한 것이 미스터링컨 등 9종, 강한 것이 엑스타세 등 41종, 중간 94종, 약한 것이 121종, 없거나 매우 약한 것이 39종이었다.

또한 장미에 가장 피해를 가하는 흰가루병에 대한 포장 발생정도는 무발생이 상그리아 94 등 3종, 피해가 거의 없는 것이 59종, 약간 있는 것이 132종, 많은 것이 61종, 심한 것이 50종, 아주심한 것이 9종으로 분류되었다.



그림 69. 유전자원 포장 전경



그림 70. 유전자원 특성조사 모습

표 13. 유전자원의 주요 특성

No.	품 종 명	화형	화색	초장 ¹⁾ (cm)	꽃 직경 ²⁾ (cm)	꽃잎수 ³⁾ (매)	향기정도	가시정도 ⁴⁾	흰 가 루 발생정도 ⁵⁾
1	가텐자바84	스탠다드	적	중간	큼	중간	중간	많음	약간있음
2	가든파티	스탠다드	백	중간	매우큼	중간	강함	적음	많음
3	가부끼89	스탠다드	노랑	작음	매우큼	중간	강함	많음	많음
4	건배	스탠다드	적	중간	중간	중간	약함	중간	약간있음
5	골드마리84	스탠다드	노랑	중간	중간	적음	없거나 매우약함	적음	거의없음
6	골드버니	스탠다드	노랑	작음	중간	많음	중간	적음	약간있음
7	골든케이트	스탠다드	노랑	중간	중간	매우많음	중간	적음	약간있음
8	그라나다	스탠다드	이중	중간	매우큼	중간	강함	적음	많음
9	그랑프리	스탠다드	적	중간	큼	중간	중간	적음	많음
10	그랜드가라	스탠다드	적	중간	큼	매우많음	중간	중간	심한편임
11	그린석세스	스탠다드	노랑	중간	중간	중간	없거나 매우약함	적음	거의없음
12	나이아	스탠다드	백	큼	중간	매우많음	중간	적음	약간있음
13	내쇼날프러스트	스탠다드	적	중간	큼	많음	중간	매우많음	많음
14	네게쉬	스탠다드	적	작음	중간	중간	없거나 매우약함	없거나 매우적음	심한편임
15	네온	스탠다드	분홍	중간	중간	중간	중간	없거나 매우적음	심한편임
16	노블레스	스탠다드	분홍	중간	중간	매우많음	중간	중간	약간있음
17	니콜	스탠다드	이중	중간	매우큼	매우많음	강함	많음	거의없음
18	니콜로파가니니	스탠다드	적	중간	중간	많음	약함	적음	약간있음
19	다까르	스탠다드	노랑	중간	중간	중간	약함	적음	많음
20	다니	스탠다드	주홍	중간	중간	많음	약함	중간	약간있음
21	다이아나	스탠다드	노랑	중간	작음	매우적음	중간	없거나 매우적음	약간있음
22	달라스	스탠다드	적	중간	중간	매우많음	중간	적음	심한편임
23	데스티니	스탠다드	이중	큼	중간	중간	약함	중간	거의없음
24	듀캣트	스탠다드	이중	중간	큼	중간	중간	중간	약간있음
25	드림	스탠다드	분홍	중간	중간	중간	약함	없거나 매우적음	심한편임
26	드프트볼케	스탠다드	분홍	중간	매우큼	많음	매우강함	적음	약간있음
27	드프트자바84	스탠다드	적	큼	큼	매우많음	강함	많음	거의없음
28	라리니	스탠다드	이중	작음	큼	중간	중간	중간	약간있음
29	라비그웨펠	스탠다드	주홍	중간	큼	매우많음	없거나 매우약함	적음	약간있음
30	라스베가스	스탠다드	분홍	작음	큼	많음	중간	적음	많음

표 13. 계속

No.	품 종 명	화형	화색	초장 ¹⁾ (cm)	꽃 직경 ²⁾ (cm)	꽃잎수 ³⁾ (매)	향기정도	가시정도 ⁴⁾	흰 가 루 발생정도 ⁵⁾
31	라이지아	스탠다드	노랑	작음	큼	많음	강함	중간	많음
32	라파엘라	스탠다드	이중	중간	큼	적음	약함	적음	많음
33	란도라	스탠다드	이중	중간	매우큼	중간	강함	적음	약간있음
34	람바다	스탠다드	주홍	중간	중간	많음	약함	많음	약간있음
35	람피온	스탠다드	주홍	작음	중간	매우적음	약함	많음	약간있음
36	러브	스탠다드	분홍	중간	큼	많음	없거나 매우약함	매우많음	거의없음
37	레드테빌	스탠다드	적	큼	매우큼	많음	중간	많음	약간있음
38	레드벨벳	스탠다드	적	작음	매우큼	중간	없거나 매우약함	중간	약간있음
39	레드산드라	스탠다드	적	큼	매우큼	매우많음	중간	중간	약간있음
40	레몬드림	스탠다드	노랑	작음	중간	적음	중간	없거나 매우적음	약간있음
41	레오니다스	스탠다드	주홍	작음	중간	중간	매우강함	중간	약간있음
42	레이디로제	스탠다드	주홍	작음	큼	중간	강함	매우많음	약간있음
43	레이디메이앙	스탠다드	주홍	큼	매우큼	중간	강함	없거나 매우적음	거의없음
44	레이저	스탠다드	분홍	중간	중간	중간	약함	많음	거의없음
45	로라	스탠다드	주홍	중간	큼	중간	약함	중간	약간있음
46	로비나	스탠다드	적	중간	큼	중간	약함	적음	심한편임
47	로얄	스탠다드	적	중간	작음	중간	없거나 매우약함	중간	약간있음
48	로얄드림	스탠다드	분홍	중간	중간	중간	중간	없음	많음
49	로즈유미	스탠다드	백	작음	중간	매우많음	약함	중간	약간있음
50	룩시	스탠다드	적	중간	큼	많음	강함	많음	약간있음
51	틀라레	스탠다드	적	중간	큼	많음	약함	중간	약간있음
52	롯데로제	스탠다드	적	중간	큼	중간	중간	중간	심한편임
53	루블	스탠다드	이중	작음	중간	중간	없거나 매우약함	없거나 매우적음	약간있음
54	루비	스탠다드	적	중간	중간	많음	중간	중간	많음
55	루스티카	스탠다드	이중	작음	매우큼	많음	매우강함	중간	약간있음
56	룰레드	스탠다드	주홍	중간	큼	적음	약함	많음	심한편임
57	리라키스	스탠다드	분홍	중간	중간	중간	없거나 매우약함	중간	심한편임
58	리모나	스탠다드	이중	큼	중간	매우많음	강함	중간	심한편임
59	리비아	스탠다드	분홍	중간	큼	중간	강함	중간	아주심함
60	리틀실버	스탠다드	보라	중간	중간	중간	강함	없거나 매우적음	심한편임

표 13. 계속

No.	품 종 명	화형	화색	초장 ¹⁾ (cm)	꽃 직경 ²⁾ (cm)	꽃잎수 ³⁾ (매)	향기정도	가시정도 ⁴⁾	흰 가 루 발생정도 ⁵⁾
61	마가렛메리	스탠다드	백	중간	큼	매우많음	약함	없거나 매우적음	약간있음
62	마갈리	스탠다드	분홍	중간	큼	중간	중간	중간	거의없음
63	마담레네로티	스탠다드	주홍	중간	중간	적음	약함	적음	거의없음
64	마담사찌	스탠다드	백	작음	매우큼	중간	매우강함	중간	심한편입
65	마리드보아	스탠다드	적	중간	큼	매우많음	약함	적음	아주심함
66	마리아칼라스	스탠다드	분홍	작음	매우큼	매우많음	약함	중간	거의없음
67	마리안텔	스탠다드	주홍	중간	중간	중간	없거나 매우약함	매우많음	약간있음
68	마벨	스탠다드	주홍	작음	중간	중간	약함	중간	거의없음
69	마스카라	스탠다드	분홍	중간	큼	적음	강함	적음	거의없음
70	마이하트	스탠다드	적	작음	큼	중간	약함	중간	아주심함
71	마-치	스탠다드	이중	중간	큼	중간	약함	중간	심한편입
72	마틸다	스탠다드	이중	중간	큼	중간	약함	매우많음	심한편입
73	매그넛	스탠다드	적	중간	큼	매우많음	약함	중간	약간있음
74	맨하탄블루	스탠다드	분홍	중간	큼	많음	중간	없거나 매우적음	심한편입
75	맹고	스탠다드	분홍	큼	중간	적음	중간	중간	약간있음
76	머라이어케이	스탠다드	이중	작음	큼	중간	중간	없거나 매우적음	약간있음
77	메테오	스탠다드	분홍	작음	중간	중간	약함	없거나 매우적음	많음
78	메스메틱	스탠다드	이중	작음	큼	많음	약함	중간	약간있음
79	멜로디	스탠다드	분홍	중간	중간	많음	없거나 매우약함	없거나 매우적음	심한편입
80	모나리자	스탠다드	분홍	중간	매우큼	매우많음	매우강함	중간	약간있음
81	몽파르나쓰	스탠다드	주홍	중간	매우큼	많음	없거나 매우약함	중간	심한편입
82	무비스타	스탠다드	분홍	중간	큼	적음	약함	중간	약간있음
83	문스트릭	스탠다드	백색	작음	작음	많음	약함	없거나 매우적음	많음
84	미스터링컨	스탠다드	적색	중간	매우큼	매우많음	매우강함	매우많음	많음
85	바록크	스탠다드	노랑	중간	큼	중간	중간	많음	거의없음
86	바이오리나	스탠다드	이중	중간	큼	매우많음	약함	중간	거의없음
87	버-디	스탠다드	노랑	중간	매우큼	많음	중간	중간	약간있음
88	베로나91	스탠다드	노랑	큼	중간	많음	매우강함	중간	약간있음
89	벨아미	스탠다드	분홍	중간	큼	중간	중간	중간	심한편입
90	브라보	스탠다드	분홍	중간	중간	중간	약함	없거나 매우적음	아주심함

표 13. 계속

No.	품 종 명	화형	화색	초장 ¹⁾ (cm)	꽃 직경 ²⁾ (cm)	꽃잎수 ³⁾ (매)	향기정도	가시정도 ⁴⁾	흰 가 루 발생정도 ⁵⁾
91	브라이달바우티	스탠다드	분홍	큼	중간	중간	강함	중간	많음
92	브라이달뷰티	스탠다드	분홍	작음	큼	중간	약함	중간	약간있음
93	브라이달핑크	스탠다드	분홍	중간	중간	중간	약함	매우많음	많음
94	블랙뷰티	스탠다드	적	작음	중간	중간	약함	없거나 매우적음	많음
95	블루바초	스탠다드	보라	중간	중간	매우많음	중간	적음	약간있음
96	블루버드	스탠다드	보라	작음	큼	매우많음	약함	중간	많음
97	블루스카이	스탠다드	분홍	중간	중간	많음	중간	중간	많음
98	비탈	스탠다드	적	작음	중간	중간	중간	적음	많음
99	빠빠용	스탠다드	노랑	중간	큼	매우많음	약함	중간	심한편입
100	사피어	스탠다드	분홍	큼	중간	중간	중간	중간	약간있음
101	사하라	스탠다드	기타	작음	중간	매우많음	중간	중간	약간있음
102	산트리아	스탠다드	이중색	중간	중간	많음	없거나 매우약함	적음	약간있음
103	상그리아 ⁹⁴	스탠다드	적	중간	중간	많음	약함	없거나 매우적음	무발생
104	샤니프로피타	스탠다드	노랑	중간	중간	많음	약함	적음	심한편입
105	샤롯데 ⁹⁵	스탠다드	적	중간	중간	중간	중간	매우많음	약간있음
106	샤샤	스탠다드	적	작음	중간	적음	강함	없거나 매우적음	심한편입
107	선글로리	스탠다드	노랑	중간	중간	매우많음	없거나 매우약함	적음	거의없음
108	섬머레이디	스탠다드	분홍	작음	매우큼	적음	중간	중간	거의없음
109	세턴	스탠다드	이중	중간	중간	많음	없거나 매우약함	중간	약간있음
110	소니아	스탠다드	분홍	중간	중간	중간	없거나 매우약함	중간	거의없음
111	소리도르	스탠다드	노랑	큼	큼	중간	중간	적음	거의없음
112	수퍼카디날	스탠다드	주홍	중간	큼	중간	중간	많음	심한편입
113	쉬라게	스탠다드	노랑	중간	매우큼	매우많음	중간	중간	약간있음
114	스브닐	스탠다드	분홍	중간	중간	중간	약함	중간	많음
115	스왈즈마돈나	스탠다드	적색	중간	중간	적음	없거나 매우약함	중간	심한편입
116	스위트니스	스탠다드	분홍	중간	중간	매우많음	약함	중간	약간있음
117	스카이라인	스탠다드	노랑	중간	큼	많음	약함	많음	약간있음
118	스타라이트	스탠다드	노랑	중간	큼	많음	강함	적음	약간있음
119	스타링 ⁹⁵	스탠다드	보라	큼	매우큼	매우많음	약함	중간	약간있음
120	스파이시	스탠다드	주황	중간	중간	중간	중간	중간	아주심함

표 13. 계속

No.	품 종 명	화형	화색	초장 ¹⁾ (cm)	꽃 직경 ²⁾ (cm)	꽃잎수 ³⁾ (매)	향기정도	가시정도 ⁴⁾	흰 가 루 발생정도 ⁵⁾
121	스페니쉬선	스탠다드	이중	큼	중간	많음	중간	많음	거의없음
122	스프레스	스탠다드	이중	작음	매우큼	매우많음	약함	적음	약간있음
123	시목스	스탠다드	주홍	작음	중간	중간	없거나 매우약함	많음	약간있음
124	실버87	스탠다드	분홍	중간	매우큼	적음	약함	중간	약간있음
125	써니스카이	스탠다드	노랑	작음	중간	매우많음	강함	적음	약간있음
126	써커스	스탠다드	이중	작음	큼	많음	중간	중간	약간있음
127	썸머드림	스탠다드	분홍	중간	큼	많음	강함	중간	약간있음
128	썸머홀리데이	스탠다드	주홍	큼	매우큼	매우많음	없거나 매우약함	많음	많음
129	아누시카	스탠다드	주홍	중간	큼	적음	중간	중간	거의없음
130	아루바	스탠다드	적	큼	큼	많음	없거나 매우약함	적음	많음
131	아마테우스	스탠다드	적	중간	큼	적음	중간	중간	약간있음
132	아메리카프라이드	스탠다드	분홍	작음	중간	많음	약함	적음	거의없음
133	아모로사	스탠다드	기타	중간	큼	중간	중간	적음	약간있음
134	아스트라	스탠다드	분홍	중간	중간	많음	약함	중간	심한편입
135	아틀	스탠다드	분홍	큼	큼	많음	없거나 매우약함	매우많음	거의없음
136	알렉스레드	스탠다드	적	중간	큼	매우많음	매우강함	중간	약간있음
137	앤비	스탠다드	백	중간	큼	중간	약함	많음	심한편입
138	에밀리	스탠다드	백	중간	중간	매우많음	중간	많음	많음
139	에블루션	스탠다드	이중	중간	중간	매우많음	중간	매우많음	약간있음
140	에스메랄다	스탠다드	적	중간	큼	중간	약함	중간	약간있음
141	에스카다	스탠다드	주홍	큼	중간	중간	약함	없거나 매우적음	이주심함
142	에스키모	스탠다드	백	중간	중간	중간	없거나 매우약함	중간	많음
143	엑스타세	스탠다드	적	작음	매우큼	많음	강함	없거나 매우적음	약간있음
144	엔젤	스탠다드	백	중간	매우큼	많음	없거나 매우약함	중간	많음
145	엘레강스	스탠다드	이중	중간	중간	매우많음	없거나 매우약함	적음	약간있음
146	엘리자	스탠다드	분홍	큼	큼	중간	약함	없거나 매우적음	약간있음
147	엘로우버드	스탠다드	노랑	큼	매우큼	중간	강함	없음	약간있음
148	오시아나	스탠다드	노랑	중간	중간	적음	중간	없거나 매우적음	거의없음
149	오클라호마	스탠다드	적	작음	매우큼	적음	약함	매우많음	약간있음
150	오픈렌스	스탠다드	백	중간	큼	매우많음	강함	매우많음	심한편입

표 13. 계속

No.	품 종 명	화형	화색	초장 ¹⁾ (cm)	꽃 직경 ²⁾ (cm)	꽃잎수 ³⁾ (매)	향기정도	가시정도 ⁴⁾	흰 가 루 발생정도 ⁵⁾
151	오피움	스탠다드	적	작음	중간	중간	없거나 매우약함	매우많음	약간있음
152	올란트	스탠다드	분홍	중간	큼	중간	강함	적음	많음
153	올리르버	스탠다드	적	큼	큼	많음	없거나 매우약함	중간	약간있음
154	올림픽터치	스탠다드	백	작음	매우큼	매우많음	강함	없거나 매우적음	많음
155	우레라	스탠다드	분홍	중간	중간	많음	중간	적음	약간있음
156	우키구모	스탠다드	백	큼	중간	많음	중간	많음	약간있음
157	위싱밀	스탠다드	백	작음	중간	중간	약함	중간	많음
158	유매	스탠다드	분홍	작음	매우큼	많음	약함	매우많음	약간있음
159	유젠	스탠다드	분홍	중간	매우큼	매우많음	중간	매우많음	심한편임
160	유토피아나	스탠다드	적	중간	중간	적음	강함	중간	심한편임
161	입성로랑	스탠다드	분홍	중간	중간	많음	약함	적음	거의없음
162	잉카	스탠다드	주황	작음	작음	적음	강함	많음	약간있음
163	자운	스탠다드	적	중간	큼	중간	중간	중간	거의없음
164	잠브라93	스탠다드	분홍	작음	매우큼	적음	약함	매우많음	많음
165	잭프러스트	스탠다드	백	작음	중간	중간	약함	적음	많음
166	잭헨젤	스탠다드	주홍	중간	중간	적음	중간	많음	약간있음
167	자스미나	스탠다드	분홍	작음	중간	중간	약함	매우많음	심한편임
168	자카란다	스탠다드	분홍	큼	큼	많음	약함	없거나 매우적음	많음
169	제이드	스탠다드	노랑	작음	중간	중간	약함	중간	약간있음
170	조셉스커트	스탠다드	분홍	중간	중간	매우많음	약함	없거나 매우적음	심한편임
171	조춘	스탠다드	분홍	작음	중간	적음	약함	없거나 매우적음	많음
172	주왕	스탠다드	적	작음	큼	많음	중간	많음	거의없음
173	쥬베나	스탠다드	백	큼	매우큼	중간	약함	중간	약간있음
174	진-피스	스탠다드	기타	작음	큼	적음	중간	없거나 매우적음	거의없음
175	차알스톤	스탠다드	이중	중간	중간	적음	약함	중간	심한편임
176	채운	스탠다드	이중	중간	매우큼	매우많음	중간	중간	약간있음
177	친친	스탠다드	주홍	작음	중간	중간	약함	중간	많음
178	카니발	스탠다드	이중	작음	중간	중간	약함	중간	거의없음
179	카디날	스탠다드	적	중간	매우큼	중간	약함	중간	약간있음
180	카라트	스탠다드	분홍	중간	중간	중간	강함	없거나 매우적음	약간있음

표 13. 계속

No.	품 종 명	화형	화색	초장 ¹⁾ (cm)	꽃 직경 ²⁾ (cm)	꽃잎수 ³⁾ (매)	향기정도	가시정도 ⁴⁾	흰 가 루 발생정도 ⁵⁾
181	카롤리네드모나코	스탠다드	이중	중간	큼	매우많음	약함	중간	거의없음
182	카르너발	스탠다드	이중	작음	큼	매우많음	약함	없거나 매우적음	많음
183	카멜로트	스탠다드	적	작음	중간	많음	강함	중간	약간있음
184	카사노바	스탠다드	주황	큼	매우큼	매우많음	강함	적음	거의없음
185	카푸치노	스탠다드	노랑	중간	큼	매우많음	중간	적음	거의없음
186	칼라브라	스탠다드	적	중간	중간	중간	없거나 매우약함	중간	심한편임
187	칼라빌다	스탠다드	주홍	작음	큼	중간	중간	적음	거의없음
188	칼랑카	스탠다드	분홍	중간	큼	적음	약함	중간	심한편임
189	칼레드	스탠다드	적	중간	중간	많음	중간	중간	많음
190	캐딜락	스탠다드	분홍	중간	중간	매우많음	약함	중간	심한편임
191	컨피던스	스탠다드	분홍	큼	큼	중간	약함	중간	심한편임
192	코러스	스탠다드	적	중간	매우큼	중간	약함	중간	거의없음
193	코사이	스탠다드	적	중간	매우큼	중간	중간	중간	거의없음
194	코이고코로	스탠다드	기타	작음	큼	매우많음	없거나 매우약함	매우많음	약간있음
195	코코	스탠다드	적	중간	중간	많음	중간	많음	심한편임
196	콘라드헨겔	스탠다드	적	작음	중간	매우많음	중간	많음	심한편임
197	콘라쉬	스탠다드	주홍	중간	중간	중간	약함	중간	약간있음
198	콘첼티노	스탠다드	적	중간	작음	적음	약함	중간	약간있음
199	콘페티	스탠다드	이중	중간	중간	중간	중간	중간	심한편임
200	콜벳	스탠다드	주홍	중간	큼	중간	약함	적음	약간있음
201	퀸엘리자베스	스탠다드	분홍	큼	큼	매우많음	없거나 매우약함	중간	약간있음
202	큐바나	스탠다드	기타	큼	중간	중간	강함	중간	약간있음
203	크리스찬	스탠다드	분홍	작음	중간	중간	중간	없거나 매우적음	약간있음
204	크리스탈라인	스탠다드	백	큼	매우큼	많음	강함	많음	많음
205	크리스토퍼콜럼보	스탠다드	주홍	중간	큼	적음	중간	많음	거의없음
206	크림프로피타	스탠다드	백	작음	작음	중간	없거나 매우약함	적음	심한편임
207	클라우디아	스탠다드	분홍	중간	큼	많음	중간	적음	많음
208	클라우스스토어데클	스탠다드	적	작음	큼	중간	강함	매우많음	약간있음
209	키스	스탠다드	분홍	작음	중간	적음	약함	없거나 매우적음	약간있음
210	타마라	스탠다드	백	중간	중간	중간	중간	없거나 매우적음	아주심함

표 13. 계속

No.	품 종 명	화형	화색	초장 ¹⁾ (cm)	꽃 직경 ²⁾ (cm)	꽃잎수 ³⁾ (매)	향기정도	가시정도 ⁴⁾	흰 가 루 발생정도 ⁵⁾
211	타임레스	스탠다드	백	중간	매우큼	중간	중간	적음	거의없음
212	탄초	스탠다드	이중	중간	큼	중간	약함	많음	거의없음
213	탐시크리트	스탠다드	적	작음	큼	중간	약함	중간	약간있음
214	탱고	스탠다드	주홍	중간	중간	많음	약함	적음	많음
215	테레사	스탠다드	분홍	중간	중간	중간	중간	중간	거의없음
216	테이네	스탠다드	백	작음	큼	매우많음	강함	중간	심한편임
217	텍사스	스탠다드	이중	큼	중간	매우많음	약함	중간	많음
218	토키메키	스탠다드	이중	중간	매우큼	중간	약함	중간	약간있음
219	토플레스	스탠다드	분홍	중간	중간	매우많음	중간	적음	거의없음
220	톤라쉬	스탠다드	주홍	작음	큼	중간	없거나 매우약함	적음	거의없음
221	트로피칼	스탠다드	주홍	중간	매우큼	중간	중간	중간	많음
222	티나	스탠다드	노랑	작음	중간	매우많음	중간	없거나 매우적음	약간있음
223	티네케	스탠다드	백색	중간	큼	매우많음	중간	적음	약간있음
224	티아모	스탠다드	적색	중간	중간	중간	없거나 매우약함	중간	심한편임
225	파레오90	스탠다드	주황	큼	중간	많음	중간	없거나 매우적음	아주심함
226	파로이티	스탠다드	이중	중간	큼	중간	약함	중간	많음
227	파린	스탠다드	주홍	작음	중간	중간	없거나 매우약함	중간	약간있음
228	파바로티	스탠다드	분홍	중간	매우큼	중간	약함	적음	심한편임
229	파이어볼	스탠다드	주홍	중간	큼	많음	강함	중간	약간있음
230	파이어인아이스	스탠다드	이중	중간	큼	중간	약함	중간	아주심함
231	파파메이앙	스탠다드	적	중간	큼	적음	중간	많음	약간있음
232	퍼스트레드	스탠다드	적	작음	큼	중간	약함	중간	약간있음
233	퍼플타이거	스탠다드	이중	작음	중간	매우많음	강함	없거나 매우적음	거의없음
234	페피타	스탠다드	분홍	중간	작음	매우많음	약함	없거나 매우적음	많음
235	푸루이트	스탠다드	주홍	작음	중간	많음	중간	중간	거의없음
236	폴문	스탠다드	노랑	중간	매우큼	중간	강함	중간	약간있음
237	퓨어포이트리	스탠다드	이중	작음	중간	많음	약함	중간	거의없음
238	프레그란트레이디	스탠다드	분홍	중간	매우큼	중간	중간	중간	약간있음
239	프로비타	스탠다드	분홍	작음	중간	많음	중간	중간	많음
240	프로이트	스탠다드	노랑	중간	작음	많음	강함	많음	많음

표 13. 계속

No.	품종명	화형	화색	초장 ¹⁾ (cm)	꽃 직경 ²⁾ (cm)	꽃잎수 ³⁾ (매)	향기정도	가시정도 ⁴⁾	흰 가루 발생정도 ⁵⁾
241	프리스코	스탠다드	노랑	작음	중간	많음	약함	없거나 매우적음	약간있음
242	프리티우먼	스탠다드	분홍	중간	큼	중간	중간	없거나 매우적음	약간있음
243	프린세스마가렛	스탠다드	분홍	큼	중간	적음	중간	중간	많음
244	프린세스모나코	스탠다드	이중색	중간	매우큼	중간	중간	중간	약간있음
245	플러트	스탠다드	분홍	중간	중간	많음	약함	없거나 매우적음	많음
246	플로렌스	스탠다드	기타	중간	중간	매우많음	약함	중간	심한편입
247	피리모	스탠다드	적	중간	큼	많음	중간	없거나 매우적음	많음
248	피스	스탠다드	노랑	작음	매우큼	매우많음	약함	중간	거의없음
249	피치앵크림	스탠다드	주홍	중간	큼	많음	없거나 매우약함	적음	거의없음
250	필링	스탠다드	분홍	중간	매우큼	중간	중간	없거나 매우적음	약간있음
251	핑크산드라	스탠다드	분홍	중간	큼	많음	약함	중간	많음
252	핑크앵크림	스탠다드	이중	작음	중간	중간	약함	적음	많음
253	하이다르고	스탠다드	적	중간	매우큼	많음	중간	매우많음	무발생
254	허니코르다나	스탠다드	노랑	작음	작음	중간	중간	중간	약간있음
255	헬로	스탠다드	이중	중간	큼	매우많음	약함	적음	심한편입
256	화이트노블레스	스탠다드	분홍	작음	중간	많음	약함	중간	약간있음
257	화이트마제스틱	스탠다드	백	중간	큼	적음	중간	중간	심한편입
258	화이트매직	스탠다드	백	작음	큼	많음	약함	없거나 매우적음	약간있음
259	화이트유로파	스탠다드	백	중간	중간	많음	중간	없거나 매우적음	심한편입
260	웨이쉬	스탠다드	분홍	작음	중간	많음	중간	중간	많음
261	웨이리아	스탠다드	이중	작음	큼	매우많음	중간	중간	약간있음
262	골드코르다나	스프레이	이중	중간	작음	매우많음	중간	중간	약간있음
263	골든마텔론	스프레이	이중	중간	작음	중간	약함	많음	많음
264	나이츠스타	스프레이	적	작음	작음	매우많음	약함	없거나 매우적음	약간있음
265	니키타	스프레이	주홍	작음	작음	많음	약함	적음	거의없음
266	다이아덤	스프레이	분홍	중간	중간	매우많음	중간	중간	약간있음
267	데이비마스케랏트	스프레이	이중	작음	작음	매우많음	약함	매우많음	약간있음
268	러블리디아	스프레이	분홍	작음	작음	많음	중간	없거나 매우적음	약간있음
269	러블리블루	스프레이	보라	작음	중간	많음	약함	매우많음	거의없음
270	레드라이어덤	스프레이	분홍	중간	중간	많음	약함	적음	약간있음

표 13. 계속

No.	품 종 명	화형	화색	초장 ¹⁾ (cm)	꽃 직경 ²⁾ (cm)	꽃잎수 ³⁾ (매)	향기정도	가시정도 ⁴⁾	흰 가 루 발생정도 ⁵⁾
271	레드마블	스프레이	적	작음	작음	중간	약함	매우많음	약간있음
272	레드코르다나	스프레이	주홍	작음	매우작음	중간	약함	많음	거의없음
273	로사다	스프레이	분홍	작음	매우작음	적음	약함	매우많음	심한편임
274	로즈마린	스프레이	분홍	중간	매우작음	매우많음	없거나 매우약함	많음	거의없음
275	리디아	스프레이	분홍	작음	작음	많음	약함	없거나 매우적음	거의없음
276	리틀마블	스프레이	주홍	작음	작음	적음	약함	많음	거의없음
277	마니쉬	스프레이	이중	중간	작음	중간	약함	중간	거의없음
278	마돈나	스프레이	적	중간	작음	중간	약함	많음	거의없음
279	마리나코르다나	스프레이	주홍	작음	매우작음	중간	약함	많음	약간있음
280	매직케노셀	스프레이	이중	중간	작음	많음	중간	중간	약간있음
281	메탈샤워	스프레이	분홍	큼	작음	매우많음	없거나 매우약함	적음	많음
282	모닝스타	스프레이	분홍	큼	중간	매우많음	중간	매우많음	약간있음
283	미미쥬리	스프레이	주홍	중간	작음	적음	약함	매우많음	약간있음
284	미야레드	스프레이	적	작음	작음	중간	없거나 매우약함	중간	약간있음
285	밀리온핑크	스프레이	분홍	작음	작음	중간	약함	없거나 매우적음	많음
286	세븐틴	스프레이	분홍	중간	중간	적음	강함	중간	심한편임
287	센타이너	스프레이	분홍	작음	작음	매우많음	약함	중간	거의없음
288	솔레로	스프레이	노랑	작음	작음	매우많음	중간	중간	약간있음
289	스윙	스프레이	분홍	중간	작음	많음	중간	없거나 매우적음	많음
290	스칼렛미미	스프레이	적	작음	작음	중간	약함	적음	거의없음
291	신데렐라	스프레이	백	중간	작음	매우많음	중간	많음	약간있음
292	썬씨티	스프레이	노랑	중간	작음	많음	약함	적음	약간있음
293	썬플라이어	스프레이	노랑	작음	중간	적음	중간	중간	약간있음
294	에벌린	스프레이	적	작음	작음	중간	없거나 매우약함	중간	많음
295	엘로우돛트	스프레이	노랑	중간	작음	중간	중간	중간	많음
296	엘로우메이앙디나	스프레이	노랑	중간	작음	중간	약함	중간	무발생
297	엘로우미미	스프레이	노랑	중간	작음	매우많음	강함	없거나 매우적음	약간있음
298	조이	스프레이	분홍	작음	작음	많음	약함	매우많음	약간있음
299	지골레드	스프레이	이중	작음	작음	많음	약함	없거나 매우적음	약간있음
300	차밍	스프레이	분홍	중간	작음	중간	중간	중간	많음

표 13. 계속

No.	품 종 명	화형	화색	초장 ¹⁾ (cm)	꽃 직경 ²⁾ (cm)	꽃잎수 ³⁾ (매)	향기정도	가시정도 ⁴⁾	흰 가 루 발생정도 ⁵⁾
301	춘무	스프레이	이중	중간	작음	많음	중간	중간	거의없음
302	칼렌슈타	스프레이	이중	작음	작음	매우많음	중간	중간	거의없음
303	콜리브리79	스프레이	백	작음	매우작음	많음	강함	매우많음	많음
304	클레멘타인	스프레이	노랑	중간	작음	매우많음	없거나 매우약함	중간	많음
305	트루드미미	스프레이	분홍	작음	작음	적음	강함	많음	약간있음
306	퍼플프린스	스프레이	분홍	중간	작음	매우많음	중간	적음	약간있음
307	페티드콜리	스프레이	이중	작음	작음	많음	중간	많음	약간있음
308	푸루푸루	스프레이	보라	중간	작음	매우많음	매우강함	적음	약간있음
309	프린세스	스프레이	백	작음	작음	적음	약함	적음	많음
310	피노키오	스프레이	분홍	중간	작음	많음	약함	중간	약간있음
311	핑크참	스프레이	분홍	작음	작음	적음	중간	중간	심한편임
312	핑크탱고	스프레이	분홍	중간	작음	매우많음	약함	없거나 매우적음	심한편임
313	화이트캔디	스프레이	백	작음	작음	많음	약함	많음	약간있음
314	후레아	스프레이	노랑	중간	중간	매우많음	중간	중간	거의없음

형질전환을 위해 기본적으로 갖추어야 하는 조건으로 재분화 시스템이 확립되어 있어야 하므로 재분화가 잘되는 장미 품종을 선발하기 위하여 포장에서 재배하고 있는 품종 중에서 로얄티 유효기간이 지난 품종과 화형, 화색 등을 고려하여 표 14와 같이 1년차에 카디날 등 27종을 선발하여 형질전환용 시료로 사용하였다.

표 14. 장미 형질전환 시험용 개화지 시료 특성

No.	품 종	화 형	화 색	특 성	육성회사
1	카디날	스탠다드(대형)	적	화색, 화형우수	(독)코르데스
2	비탈	"	적	콜벳 변이지	(독)코르데스
3	레드산드라	"	적	화색, 화형우수	(독)코르데스
4	콜벳	"	주홍	화색, 화형우수	(독)코르데스
5	로즈유미	"	백	화색, 화형우수	(일)경성장미
6	스타라이트	"	황	향기 강	(프)메이앙
7	입센로랑	"	분홍	화색, 화형우수	(프)메이앙
8	피스	"	백	대표적 정원용장미	Brady
9	노블레스	"	분홍	화색, 화형우수	(독)탄타우
10	골든게이트	스탠다드(중형)	황	화색, 화형우수	(독)코르데스
11	차밍	스프레이	분홍	화색, 화형우수	(일)경성장미
12	리틀마블	"	주홍	화색, 화형우수	(화란)데루이텔스
13	엑스타세	스탠다드(대형)	적	향 강	(독) 코르데스
14	리모나	스탠다드(대형)	크림	향 강	(독) 코르데스
15	썬커스	스탠다드(대형)	황홍	화색, 화형우수	(독) 코르데스
16	키스	스탠다드(대형)	분홍	가시적음	(독) 코르데스
17	스프레스	스탠다드(대형)	라이트핑크	가시적음	(독) 코르데스
18	레몬드림	스탠다드(대형)	연황	가시적음	(독) 코르데스
19	그랜드가라	스탠다드(대형)	적	꽃잎수 많음	(프) 메이앙
20	에블루션	스탠다드(대형)	크림핑크	화색, 화형우수	오라이로젠
21	로얄	스탠다드(대형)	적	흑적색	(일) 경성장미
22	콘페티	스탠다드(대형)	황적	화색, 화형우수	(독) 탄타우
23	티아모	스탠다드(대형)	적	다수성	(독) 코르데스
24	마치	스탠다드(대형)	적황	화색, 화형우수	
25	프린세스	스프레이	백	화색, 화형우수	(네) 인터플란트
26	러블리블루	스프레이	연보라	화색, 화형우수	(일)경성장미
27	스칼렛트미	스프레이	분홍	화색, 화형우수	(일)경성장미

형질전환을 위한 2~3년차에 제공한 시료내용은 표 15, 표 16 과 같다. 로얄티 등을 회피하기 위해 전라남도농업기술원에서 육성하여 특성을 검토 중인 '99년 교배계통 5종(육성품종 템퍼라, 스칼라 포함), '00년 교배계통 개화지 6종을 시험시료로 제공 하였다.

표 15. 전남도원 육성장미 형질전환 시험용 개화지 시료 특성

No.	교 배 조 합	교배모본의 화형, 화색		선발계통 특성			
		부 본	모 본	화형	화색	가시 ¹⁾	향기 ²⁾
1	JR9911-03(실버87/엑스타세)	스탠다드,분홍	스탠다드,적	스탠다드	적	5	0
2	JR9923-01(푸루이트/엑스타세)	스탠다드,주홍	스탠다드,적	스탠다드	적	7	7
3	JR9931-02(센티나/리모나)	스탠다드,분홍	스탠다드, 백	스탠다드	진분홍	7	5
4	JR9937-04(주베나/입생로랑)	스탠다드, 백	스탠다드,분홍	스탠다드	분홍	5	3
5	JR99V-01(티아모변이지)	-	스탠다드, 적	스탠다드	주홍	7	3
6	JR0002-44(니콜/리모나)	스탠다드,적백	스탠다드,백	스탠다드	황적	7	0
7	JR0004-31(니콜/티아모)	스탠다드,적백	스탠다드,적	스탠다드	적백	7	0
8	JR0004-32(니콜/티아모)	스탠다드,적백	스탠다드,적	스탠다드	적백	7	0
9	JR0007-03(니콜/레드산드라)	스탠다드,적백	스탠다드,적	스탠다드	적	7	7
10	JR0032-01(노블레스/리모나)	스탠다드,분홍	스탠다드,백	스탠다드	백	1	3
11	JR0036-41(티아모/리틀마블)	스탠다드,적	스프레이,주홍	스프레이	주홍	5	3

¹⁾가시 0(없음), 1(매우적음), 3(적음), 5(중간), 7(많음), 9(아주많음)

²⁾향기 0(없음), 1(아주약함), 3(약함), 5(중간), 7(강함), 9(매우강함)

	
<p>계통명 : 템퍼라</p> <p>○ 교배조합 : 주베나× 입생로랑</p> <p>○ 주요특성 연분홍색, 화색·화형 우수, 꽃잎수 36매, 절화장 64cm, 절화수량 연 110본/m²</p>	<p>계통명 : 스칼라</p> <p>○ 티아모 변이지</p> <p>○ 주요특성 주홍색, 중형, 다수성, 꽃잎수 32매, 절화장 62cm, 절화수량 연 186본/m²</p>

그림 71. 전라남도농업기술원 육성 장미의 특성

또한 종자를 이용한 형질전환 시험을 위해 유망한 교배조합을 작성하여 26조합의 결실과 및 종자를 표 15과 같이 시험재료로 제공 하였다.

표 16. 장미 형질전환을 위한 종자 시료내역

No.	교 배 조 합	교배모본의 화형, 화색		시 료
		부 분	모 본	
1	마가리/ 카디날	스텐다드,분홍	스텐다드, 적	결실과 1과
2	롯데로제/카디날	스텐다드,적	스텐다드, 적	결실과 1과
3	차밍/리모나	스프레이,백	스텐다드, 백	결실과 1과
4	트루드미미/리모나	스프레이,분홍	스텐다드, 백	결실과 1과
5	마돈나/리모나	스텐다드,적	스텐다드, 백	결실과 1과
6	망고/니콜	스텐다드,적	스텐다드, 적백	결실과 1과
7	아모로사/노블레스	스텐다드,백	스텐다드,분홍	결실과 1과
8	센타이너/리모나	스프레이,분홍	스텐다드,백	결실과 1과
9	프레그란트레이디/카디날	스텐다드,분홍	스텐다드,적	결실과 1과
10	크리스탈라인/니콜	스텐다드,백	스텐다드,적백	결실과 1과
11	니콜/파파메이앙	스텐다드,적백	스텐다드,적	결실과 2과
12	니콜/파이어볼	스텐다드,적백	스텐다드,적	종자 30개
13	리틀마블/차밍	스프레이,주홍	스프레이,백	종자 10개
14	러블리리디아/마조리카	스프레이,분홍	스프레이,백	종자 30개
15	러블리리디아/엘로우미미	스텐다드,분홍	스텐다드,황	종자 30개
16	노블레스/입생로랑	스텐다드,분홍	스텐다드,분홍	종자 50개
17	티아모/카디날	스텐다드,적	스텐다드,적	종자 20개
18	니콜/엑스타세	스텐다드, 적백	스텐다드, 적	결실과 1과
19	니콜/오클라호마	스텐다드, 적백	스텐다드, 적	결실과 1과
20	비탈/카디날	스텐다드, 적	스텐다드, 적	결실과 2과
21	비탈/레드산드라	스텐다드, 적	스텐다드, 적	결실과 2과
22	노블레스/프리티우먼	스텐다드, 분홍	스텐다드, 분홍	결실과 2과
23	노블레스/벨아미	스텐다드, 분홍	스텐다드, 분홍	결실과 2과
24	마돈나/리틀마블	스프레이,적	스프레이,주홍	결실과 4과
25	마돈나/마니쉬	스프레이,적	스프레이,백분홍	결실과 3과
26	화이트캔디/마니쉬	스프레이,백	스프레이,백분홍	결실과 3과

2) 품종별 장미 화질 및 신선도 유지에 대한 폴리아민의 영향

절화장미의 수확전 품질에 미친 요인은 재배방법, 품종, 온도, 습도, 보광, 채화단계 등이 영향을 미치며 수확후 절화 신선도에 관여하는 요인은 시간, 온도, 상대습도, 에틸렌, 건물중, 세균, 잿빛곰팡이균 등이 있다. 이 중 에틸렌은 많은 절화의 품질유지기간을 단축시키며 화중에 따라 영향의 상대적 비율이 다른 것으로 알려져 있다.

절화품질에 미치는 폴리아민의 영향을 구명하기 위해 폴리아민을 카디날 (그림 72)과 비탈 (그림 73)에 처리한 결과 노화가 약 2일 정도 지연되는 결과를 나타내었다. 특히 절화 후 7일된 경우 대조구의 경우 두 품종 모두에서 노화현상이 급격하게 일어나 꽃잎의 말림현상과 꽃잎의 마름 현상을 볼수 있었으나 폴리아민 처리구에서는 특히 spermidine과 spermine 처리구에서는 여전히 높은 수준의 수분함량을 보유하고 있었으며 꽃잎 말림 현상도 적게 나타났다. 또한 폴리아민 처리구에서 꽃의 개화가 더욱 높게 나타났으며 꽃잎에서의 수분함량도 높게 지속되었으며 장미 꽃의 목굽음 현상도 현저하게 지연되어 나타났다. 특히 절화 후 4일이 경과된 경우 폴리아민 처리구에서 꽃의 개화정도가 더욱 촉진되어 나타났는데 (그림 74, 75) 이는 수분 흡수의 증가로 꽃잎 세포의 팽창 정도가 높았기 때문인 것으로 생각된다. 이러한 현상은 여러 장미의 품종에서 모두 공통적으로 폴리아민을 처리할 때 나타나는 현상이었다. 그러므로 1차적으로 폴리아민이 카디날과 비탈 등 2종류의 장미 꽃의 개화와 화질 및 신선도 유지에 효과적이라는 결론을 얻었다. 또한 폴리아민 처리구에서 모두 조직내 폴리아민의 함량이 비교적 높은 수준이 유지됨으로써 이러한 효과는 세포내 폴리아민의 함량 증가로 팽압 등이 잘 유지되었으며 이로서 수분 흡수가 더욱 용이하였고 폴리아민이 에틸렌 생성을 지연시킴으로써 노화를 지연시키는 효과도 갖는 것으로 사료되었다.



그림 72. 카디날 폴리아민 처리 7일 경과 후



그림 73. 비탈 폴리아민 처리 7일 경과 후



그림 74. 카디날 폴리아민 처리 4일 경과 후



그림 75. 비탈 폴리아민 처리 4일 경과 후

카디날을 절화한 후 증류수에 방치한 다음 절화일수에 따른 SAMDC 활성을 조사하여 본 결과 절화 1일에 가장 높은 SAMDC 활성을 나타내었으나 점차 시간이 경과할수록 SAMDC의 활성이 줄어들었다가 꽃잎이 마르고 노화가 진행되는 시기에 오히려 증가하였다(그림 76). 이는 장미 꽃잎이 노화가 되면서 수분부족 현상을 겪기 때문에 수분 스트레스에 민감하게 작용하는 SAMDC의 활성이 증가한 것으로 생각된다. 노화 후기의 꽃잎에서 SAMDC의 활성이 증가하는 것은 장미 꽃잎에서 뿐만 아니라 다른 식물체인 카네이션, 페튜니아 등의 꽃잎에서도 나타나는 보편적인 현상으로 여겨진다.

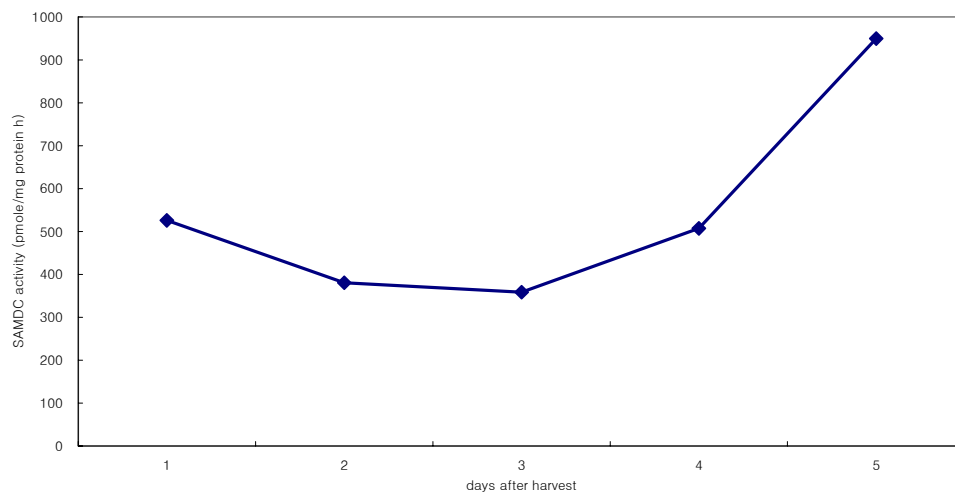


그림 76. 카디날 절화 장미의 절화일수 에 따른 SAMDC 활성 변화

다음으로는 절화시점에서 카디날과 비탈의 꽃과 잎에서 폴리아민 함량을 조사하였다. 그림 69, 70, 71, 72 에서 보듯이 장미 두 품종 모두에서 putrescine이 가장 높은 함량을 나타내었으며 그 정도는 다른 polyamine인 spermidine이나 spermine보다 10배 이상 높은 함량 이었다. Putrescine의 함량은 비탈보다는 카디날에서 더 높은 함량을 나타내었으며 두 품종 모두 꽃잎보다는 잎에서 더 높은 함량을 나타내었으며 특히 카디날의 꽃잎에서는 spermine이 비교적 높은 함량을 나타내었다. 따라서 폴리아민의 절화수명을 조절하기 위해서 putrescine, spermidine 혹은 spermine 중 어떤 것을 조절할 때 가장 효과적인지에 대한 추가 연구가 필요하다고 생각한다.

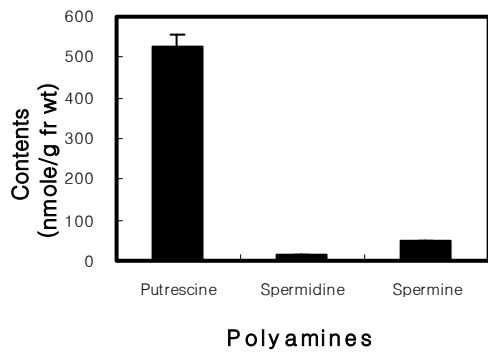


그림 77. 카디날 꽃잎에서의 폴리아민 함량

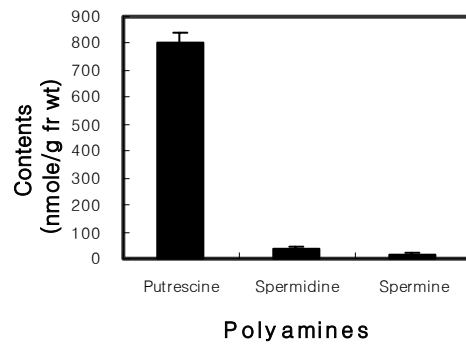


그림 78. 카디날 잎에서의 폴리아민 함량

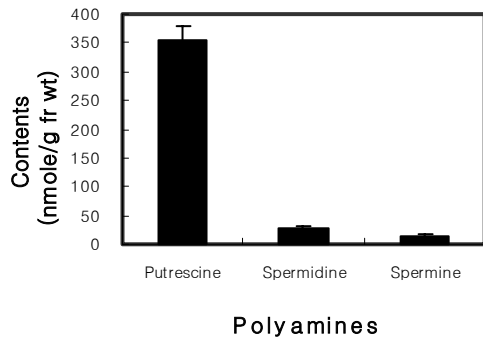


그림 79. 비탈 꽃잎에서의 폴리아민 함량 분석

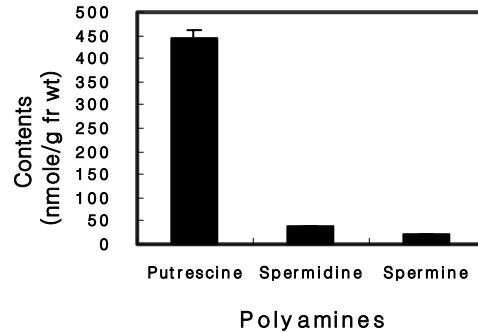


그림 80. 비탈 잎에서의 폴리아민 함량 분석

3) 형질전환 식물체 순화, 번식, 계통전개 및 간이 특성조사

형질전환 식물체를 현재 육성하여 순화 및 형질전환 여부를 확인하는 과정에 있어 확인이 끝나는데로 유식물체 순화, 계통 육성 및 증식, 특성조사를 수행할 예정이다.

4) 적요

장미 형질전환용 시료를 선발하여 시료로 제공하고자 본원에 수집된 유전자원에 대한 특성조사를 수행하여 유망한 품종과 종자를 선발하였고 폴리아민의 생리활성 연구를 위해 주요 품종을 가지고 화질 및 노화정도를 조사하였는데 그 결과는 다음과 같다.

가. 형질전환용 장미 시료를 선발하고자 본원 포장에 식재된 314종의 유전자원에 대한 특성을 조사한 결과, 화형은 스탠다드가 261종, 스프레이가 53종이었으며 화색은 분홍, 적색, 노랑, 주홍, 백색이 주종이었고 가시가 없는 품종은 로얄드립 등 2종이었다. 꽃잎 수는 매우 많은 것이 57종이었고, 향기는 매우 강한 것이 미스터링컨 등 9종이었으며 장미에 가장 피해를 미치는 흰가루병에 대한 포장 발생정도는 무발생이 상그리아 94 등 3종, 피해가 거의 없는 것이 입생로랑 등 59종이었다.

나. 형질전환용 장미 시료는 특성조사 314품종 중 주요특성이 우수하다고 판단되어지는 품종으로 스탠다드계로는 카디날 등 22종, 스프레이계로는 리틀마블 등 5종과 전라남도농업기술원에서 육성한 품종 템퍼라 등 11종과 교배종자 26종을 형질전환 시료로 선발 제공하였다.

다. 품종별 장미 화질 및 신선도 유지에 대한 폴리아민의 영향은 폴리아민 처리 후 노화가 약 2일 정도 지연되었고 처리 7일 후에도 spermidine과 spermine 처리에서는 높은 수준의 수분을 보유하였으며 꽃잎 말림 현상도 적게 나타났다. 절화일수에 따른 SAMDC 활성은 절화 1일에 가장 높은 SAMDC 활성을 나타내었으며 일자가 경과할수록 SAMDC의 활성이 감소하다가 꽃잎이 마르고 노화가 진행되는 시기에 오히려 증가하였다. 절화시점에서 카디날과 비탈의 꽃과 잎의 폴리아민 함량은 두 품종 모두에서 putrescine이 가장 높은 함량을 나타내었다.

라. 형질전환 식물체 순화, 번식, 계통전개 및 특성조사는 형질전환 식물체를 현재 육성하여 순화 및 형질전환 여부를 확인하는 과정에 있어 확인이 끝나는데로 유식물체 순화, 계통육성 및 증식, 특성조사를 수행할 예정이다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1절. 연구개발 목표와 내용 및 평가의 착안점

1. 연구개발 목표

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2001)	SAMDC 과다발현 재조합 DNA (<i>in vitro/in vivo</i> 용) 제조 및 <i>in vitro</i> 실험 수행	<ul style="list-style-type: none"> ○ SAMDC uORF를 포함한 과다발현 재조합 construct I의 <i>in vitro</i> 활성 분석 ○ 장미의 화질 및 신선도 유지에 대한 폴리아민이 미치는 영향 및 생리적 역할 규명 ○ 장미 형질전환 기법 확립 ○ construct I이 도입된 형질전환 장미 제조 ○ 특성 개량용 장미 재배 및 품종 선정 (국산 품종 위주로 묘본 선발)
2차 년도 (2002)	SAMDC 과다발현 신품종 장미 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 형질전환 장미의 transgene 분석 ○ 형질전환 장미의 세포내 폴리아민 함량 및 폴리아민 합성 효소활성 분석 ○ 형질전환 유식물 순화, 계통전개 및 특성조사
3차 년도 (2003)	형질전환 장미의 실용화 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 장미의 화질 및 특성 검정 ○ SAMDC 과다발현 장미의 환경스트레스 저항성 및 내병성 조사 ○ 항산화 효소 발현 및 활성 조절 연구 ○ 병원균 관련 유전자 발현 및 활성조절 연구 ○ 유망계통 생산력검정 및 농가실증시험 ○ 농가에서 사용 가능한 접목묘와 삽목묘 생산 연구

2. 연구평가의 착안점

구분	평가의 착안점 및 척도	
	착안사항	척도(점수)
1차년도 (2001)	○ SAMDC construct의 SAMDC 활성화에 대한 <i>in vitro</i> 실험	10
	○ 장미의 화질 및 신선도 유지에 대한 폴리아민이 미치는 영향 및 생리적 역할 규명	25
	○ 장미 형질전환 기법 확립	25
	○ Construct I이 도입된 형질전환 장미 제조	30
	○ 형질전환용 장미 재배 및 선발: 국내 개발 품종 중심으로	10
2차년도 (2002)	○ Construct I이 도입된 형질전환 장미 중 폴리아민 합성 유전자 활성화 분석	20
	○ 형질전환 장미의 transgene 분석	30
	○ 형질전환 장미의 세포내 폴리아민 함량 및 폴리아민 합성 효소활성 분석	20
	○ 형질전환 유식물 순화, 계통전개 및 특성조사	15
3차년도 (2003)	○ SAMDC 과다발현 장미의 환경스트레스 저항성 및 내병성 조사	20
	○ 장미의 화질 및 특성 검정	20
	○ 항산화 효소 발현 및 활성화 조절 연구	15
	○ 병원균 관련 유전자 발현 및 활성화조절 연구	15
	○ 유망계통 생산력검정 및 농가실증시험	15
	○ 농가에서 사용 가능한 삼목묘와 접목묘 생산 연구	15
최종평가	○ 환경저항성, 내병성의 신품종 장미 개발	60
	○ 농가보급용 장미 삼목묘/접목묘 개발	40

2절. 연구개발 목표의 달성도

구분	연구개발 목표	달 성 도
목표 1	<ul style="list-style-type: none"> ○ SAMDC uORF를 포함한 과다 발현 재조합 construct I의 <i>in vitro</i> 활성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 100 % 달성 ○ SAMDC uORF가 transcriptional inhibitor로 작용할 가능성을 밝힘. ○ SAMDC uORF의 localization이 세포질이라는 것을 확인 ○ uORF protein의 phosphorylation확인 ○ SAMDC uORF 작용기작이 ribosomal stalling과 leaky scanning이라는 것을 밝힘
목표 2	<ul style="list-style-type: none"> ○ 장미의 화질 및 신선도 유지에 대한 폴리아민이 미치는 영향 및 생리적 역할 규명 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 100% 달성 ○ 폴리아민이 절화장미의 신선도를 2일 정도 증가시키는데 이는 에틸렌 합성 억제제로 인한 것임을 밝힘
목표 3	<ul style="list-style-type: none"> ○ 장미 형질전환 기법 확립 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 100% 달성 ○ 총 30종의 장미 품종을 대상으로 형질전환 능력 연구 ○ Micro propagation 및 장미regeneration 기법 확립 ○ 장미형질전환을 위한 최적 기법 확립- 장미의 embryo callus를 이용한 형질전환기법확립
목표 4	<ul style="list-style-type: none"> ○ Construct I이 도입된 형질전환 장미 제조 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 60% 달성 ○ 장미형질전환 최적 기법을 형질전환가능성이 가장 높은 것으로 연구된 로즈유미 품종에 적용, 현재 SAMDC construct I을 도입한 형질전환 embryo callus에서 신초형성을 위한 연구 수행중
목표 5	<ul style="list-style-type: none"> ○ 특성 개량용 장미 재배 및 품종 선정(국산품종 위주로 모본선발) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 100% 달성 ○ 본 연구 시스템에서 형질전환 가능성이 가장 높은 개량용 장미를 선별하기 위한 장미 재배 및 품종 연구 수행
목표 6	<ul style="list-style-type: none"> ○ Construct I이 도입된 형질전환 장미 중 폴리아민 합성 유전자 활성 분석 ○ 형질전환 장미의 세포내 폴리아민 함량 및 폴리아민 합성 효소 활성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 40% 달성 ○ 장미형질전환 최적 기법을 형질전환가능성이 가장 높은 것으로 연구된 로즈유미 품종에 적용하여 현재 SAMDC construct I을 도입한 형질전환 embryo callus에서 신초가 형성되고 형질전환이 되었다고 판단이 되면 폴리아민의 함량 및 폴리아민 합성효소의 활성을 분석할 예정이다.
목표 7	<ul style="list-style-type: none"> ○ SAMDC 과다발현 장미의 환경 스트레스 저항성 및 내병성 조사 ○ 항산화 효소 발현 및 활성 조절 연구 ○ 병원균 관련 유전자 발현 및 활성조절 연구 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 40% 달성 ○ 형질전환 embryo callus에서 신초가 형성이 되어 형질전환이 되었다고 판단이 되면 각종 항산화 효소 및 병원균 관련 유전자의 발현을 분석할 예정이다.

1. 1차년도 계획대비 진도표

당초계획은 -----, 진도는 —— 표시

개발내용 / 구분	연구 개발 기간											진도 (%)	
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
○ 제 1 세부 과제													100
- SAMDC uORF를 포함한 과다발현 재조합 construct (Construct I) 활성 분석													
- <i>in vitro</i> 에서 Construct I (이미 확보하고 있는 construct)과 Construct II의 발현 조사													100
- <i>in vivo</i> 용 Construct I과 Construct II 제조													
- 장미의 화질 및 신선도 유지에 대한 폴리아민에 대한 생리적 역할 규명													100
- 장미 형질전환 기법 확립													80
- 장미에 construct I 도입													
○ 제 2 세부과제													100
- 형질전환용 장미 품종 선별													
- 폴리아민의 생리활성 연구용 장미 재배													100
- 품종별 장미의 화질 및 신선도 유지에 대한 폴리아민의 영향													100
총 진 도 율													95

2. 2차년도 계획대비 진도표

당초계획은 -----, 진도는 ————— 표시

구분 개발내용	연구 개발 기간												진도 (%)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
○ 제 1 세부 과제 - Construct I이 도입된 형질전환 장미 중 폴리아민 합성 유전자 활성 분석 - 형질전환 장미의 transgene 분석 - 형질전환 장미의 세포내 폴리아민 함량 및 폴리아민 합성 효율성 분석	SAMDC유전자를 이용하여 장미 형질전환 식물체 선별중(선별이 끝난 식물체를 바로 이용할 것임)												80	
	—————→												60	
	—————→												40	
○ 제 2 세부 과제 - 형질전환 유식물 순화, 계통전개 및 특성 조사 - 2차년도 연구계획에는 없는 내용이지만 도입유전자 발현정도를 분석하기 위한 연구 수행	형질전환을 위한 유전자원 관리(도입 및 자체 육성계통) —————→												70	
	형질전환 장미 유식물 순화, 번식, 계통전개 형질 전환장미 간 특성조사 : 화색, 가지, 향등 —————→												200	
	SAMDC uORF의 작용 기작 분석, 특히 uORF 단백질의 phosphorylation 정도에 따른 유전자 발현 정도 분석 —————→													
총 진 도 율														70

3. 3차년도 계획대비 진도표

당초계획은 -----, 진도는 —— 표시

구분 개발내용	연구 개발 기간												진도 (%)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
○ 제 1 세부 과제														
- SAMDC 과다발현 장미의 환경 스트레스 저항성 및 내병성 조사														40
- 장미의 화질 및 특성 검정														40
- 항산화 효소 발현 및 활성 조절 연구														40
- 병원균 관련 유전자 발현 및 활성조절 연구														40
○ 제 2 세부 과제														
- 유망계통 생산력검정 및 농가실 증시험														60
- 농가에서 사용 가능한 삼목묘와 접목묘 생산 연구														60
총 진 도 율														50

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1절. 기대효과

1. 기술적 측면

화훼작물의 재배시설에서 토양의 염도 증가 및 화훼작물의 병원균 피해에 저항성을 갖는 화훼작물을 개발하기 위하여 유전자 형질전환 기법을 사용하여 화훼작물을 개발한다면 국내에서 개발된 고품질의 장미 묘종을 농가에 보급할 수 있을 것이다. 현재 장미를 절화하여 판매가 되었을 경우 소비자들이 꽃병에 꽂아 놓았을 때 줄기 밑부터 병원균에 감염되거나 곰팡이가 발생하여 꽃병에서의 수명이 짧고 소비자들이 불쾌감을 느끼므로 꽃의 품질이 가격이 저렴한 상황이다. 특히 장미 꽃이 시들지 않은 상태에서도 줄기에서의 곰팡이 감염 등으로 그냥 버려지는 경우가 많다. 그러므로 병원균 저항성이 있는 고품질 장미는 장미의 꽃병에서의 수명을 길게 늘려 소비자가 쾌적하게 꽃을 오랫동안 감상할 수 있는 기회를 제공하게 될 것이다.

2. 경제 · 산업적 측면

내한성의 장미는 장미 재배 농가의 겨울철 난방비를 절감하게 하며 병원균 저항성 장미의 특성은 농약 사용량의 비용을 절감할 수 있을 것이며 또한 점차 토양의 이온함유량 증가가 시설 원예 농가의 커다란 장애요인이 되고 있는데 이러한 측면에서도 내염, 내한성, 내병원성 장미는 크게 환경저항성을 나타내어 지속적으로 고품질의 장미를 생산하는데 기여할 수 있을 것이다. 또한 고품질의 장미는 장미 소비욕구를 확대시켜 장미 소비량을 크게 늘릴 수 있을 것이므로 농가 소득 향상에 크게 기여할 수 있을 것이다. 따라서 본 연구에서 개발하게 될 고품질의 장미는 생산단가를 낮추고 판매단가를 높이는 효과를 가져올 수 있어 더욱 농가 소득 향상에 더욱 효과가 클 것으로 생각된다.

2절. 활용방안

- 장미에 적용된 내한, 내염, 내병성 및 수확 후 저장성 증진의 특성은 다른 화훼작물에도 적용하는 것이 가능하며 앞으로 벼 등의 다양한 경제작물에도 적용할 수 있다.
- 신품종 장미는 교배육종의 모본으로 사용하여 신품종 개발에 활용할 수 있다.
- 본 연구에서 개발될 고품질의 장미는 농가 보급용으로 개발하여 실제 농가에 보급토록 함으로써 외국에 부담하는 로얄티 부담을 줄인다.
- 내한성을 증진시킴으로써 시설원예에서 부담해야 하는 난방비를 절감하며 흰가루병 등에 대한 내병성을 증진시켜 유황혼증이나 농약 사용량을 절감시킨다.
- 본 연구에서 개발된 환경저항성 작물은 특히 중금속에 오염된 토양환경에서도 적응력이 높을 것이 예상되므로 phytoremediation 용으로도 적용해 볼 수 있다.

제 6 장 참고문헌

- 1) 김기선, 신학기, 정항영, 김규원, 김의영, 정순경 (2000) 장미·국화·카네이션, 새로운 기술과 경영, 농민신문사.
- 2) 차병진, 이형래, 백기엽, 이상선 (1998) 장미 병충해와 생육장해. 이렇게 막는다. 도서출판 서원.
- 3) Bolwell, G. P. (1995) *Biochemical Society Transactions* 24, 438-442.
- 4) Caldarella, C.M., Zappia, V. and Bachrach, U. eds., Raven press, New York. pp27-37.
- 5) Chamnongpol, S., Willekens, H., Moeder, W., Langerbartels, C., Sandermann, H., Montague, M., Inze, D., Camp, W. (1998) *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95, 5818-5823.
- 6) Chang K.S., Lee S. H., Hwnag, S. B., Park, K. Y. (2000) *Plant Journal* 24, 45-56.
- 7) Chomczynski, D., and N. Sacchi, (1987) *Annual Biochemistry* 162, 156.
- 8) Dibble, A.R.G., Davies, P.J. and Mutschler, M.A. (1988) *Plant Physiology* 86, 338-340.
- 9) Evans, P.T. and Malberg, R.L. (1989) *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology* 40, 235-269.
- 10) Fuhrer, J., Kaur-Sawhney, R., Shih, L., and Galston, A.W. (1982) *Plant Physiology* 70, 1597-1600.
- 11) Galston, A.W., Kaur-Sawhney, R., Altabella, T., Tiburcio, A.F. (1997) *Botanica Acta* 110, 197-207.
- 12) Grillo, M.A., Bedino, S., Testore, G. (1981) In *Advances in Polyamine Research. Vol III.*
- 13) Huhtinen, O., Honkanen, J. and Simola, L.K. (1982) *Plant Science Letters* 28, 3-9.
- 14) Inze, D., Montague, M. (1995) *Current Opinion in Biotechnology* 6, 153-158.
- 15) Kurepa, J., Smalle, J., Montague, M., Inze, D. (1998) *Plant Cell Physiology* 39, 987-992.
- 16) Lee, M.M., Lee, S.H. and Park, K.Y. (1997) *Physiology in Plant* In press.

- 17) Pajunen, A., Crozat, A., Janne, O.A., Ihalainen, R., Laitinen, P.H., Stanley, B., Madhubala, R., and Pegg, A.E. (1988) *Journal of Biological Chemistry* 263, 17040-17049.
- 18) Park, K.Y. and Lee, S.H. (1994) *Physiology in Plant* 90, 382-390.
- 19) Prasad, T. (1996) *Plant Journal* 10, 1017-1026.
- 20) Reggiani, R., Hochkoppler, A., Bertani, A., (1989) *Plant Cell Physiology* 30, 893-898.
- 21) Roberts, S., Wells, R. and Rechsteiner, M. (1986) *Science* 234, 364-358.
- 22) Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson, (1977) *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 74, 5463-5467.
- 23) Slocum, R.D. and Galston, A.W. (1985) *Plant Physiology* 79, 336-343.
- 24) Wang, Z., and M.S. Sachs, (1997) *Molecular and Cellular Biology* 17, 4904-4913.
- 25) Yamakawa, H., Kamada, H., Satoh, M. Ohashi, Y. (1998) *Plant Physiology* 118, 1213-1222.
- 26) Ye, B., Herbert, H., Zhang, J., Gressel, (1997) *Plant Physiology* 115, 1443-1451.
- 27) Yong-Qiang Gu, Caimei Yang, Venkatappa K. Thara, Jianmin Zhou. and Gregory B. Martin, (2000) *The Plant Cell* 12, 771-786.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.