

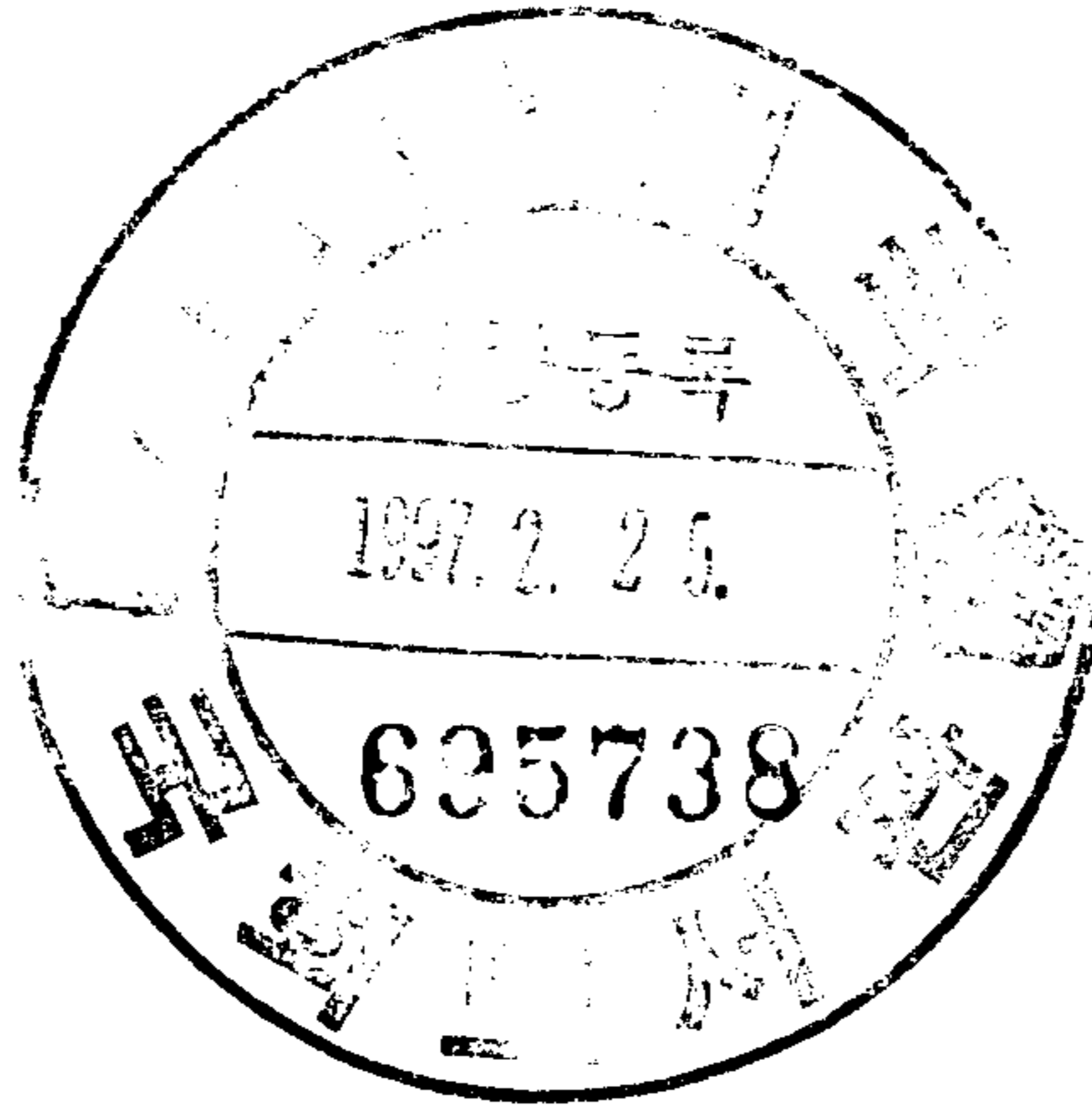
최종 보고서

고추 생력재배를 위한 엽 및 과실 노화억제품종 육성기술 개발  
Development of anti-senescence variety in hot pepper

연구기관

충남대학교

농림수산부



# 최종보고서

1996년도 농림수산물기술개발사업에 의하여 수행 중인 “고추 생력재배를 위한 엽 및 과실 노화억제품종 육성기술 개발”에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다

붙임 1. 최종요약보고서 10부

2. 자체평가의견서 10부

1996. . . .

주관 연구 기관 : 충남대학교

총괄연구책임자 : 임 용 표 (인)

주관연구기관장 : (직인)

농림수산부장관 귀하

# 제 출 문

농림수산부 장관 귀하

본 보고서를 “고추 생력재배를 위한 엽 및 과실 노화억제품종 육성기술 개발에 관한 연구” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

1996. . .

주관연구기관명 : 충남대학교

총괄연구책임자 : 임용표

# 요 약 문

## I. 제 목

고추 생력재배를 위한 엽 및 과실 노화억제품종 육성기술 개발에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

고추는 전세계에서 우리 나라의 소비가 가장 많고, 재배면적도 전세계에서 가장 많다. 고추의 수확시 고추의 불균등한 성숙 및 조기 노화로 인하여 여러 번 수확을 실시하고 있는 것이 현실이다. 또한 피만 고추의 경우는 엽의 조기 낙엽으로 인하여 과피에 직사광선에 의한 엽소현상이 발생하여 상품 가치를 떨어뜨리고 있다. 본 연구에서는 노화 직전의 성엽 및 성과에 cytokinin의 함량을 증대시켜 엽의 노화를 지연시키기 위하여, cytokinin을 생성할 수 있는 유전자를 주변 온도가 38°C 이상일 때 유전자를 발현시키는 heat shock promoter (hsp)와 결합시켜 고추에 형질 전환시킴으로써 포장에서 하절기 고추재배시 고추의 엽 및 과실의 노화를 억제할 수 있는 새로운 신종의 고추 품종을 창성하는데 그 목적이 있다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

고추의 조직배양을 통한 재분화 및 형질전환을 대량으로 할 수 있는 획기적 기술을 개발하였으며, 동시에 IPT (isopentyl transferase: cytokinin 합성 유전자) 유전자의 삽입을 시도하여 고추 향촌 및 오리엔탈G 피만 품종에 IPT 유전자를 함유한 LBA4404::pMON595를 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용하여 형질전환 시켰으며, 형질 전환된 고추 식물체의 유전자 삽입여부를 검토하였다.

#### IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

##### <연구개발 결과>

1. 고추의 형질전환율을 획기적으로 개선시켰음 (4% --> 27.3%)
2. IPT유전자를 삽입한 100여 개체의 재분화 고추를 획득하였음.
3. 본 연구를 통하여 획득된 개체의 형질전환 여부를 일부 확인한 결과 재분화 식물체중 85%의 식물체에 유전자가 삽입되었음을 확인할 수 있었음.

##### <활용에 대한 건의>

1. 고추의 형질전환 기술은 고추에 대한 생명공학적 접근에 있어서 가장 큰 장애 요인으로 과기처 G7 project에서도 몇 개의 과제가 수행되는 반드시 극복되어야 할 필요 기술로서 본 기술이 확립되어 앞으로 유용 유전자(내병성, 내충성, 내제초제성, 내virus성 등)의 대량 형질전환의 길을 열게 되었으며, 이의 경제적 효과는 그 동안 관련 과제에서 투여된 십억원이상의 효과가 있을 것이며, 본 과제의 기술을 국내 학계에 보급할 수 있다면, 그 효과는 지대하리라 사료됨.
2. 본 과제를 통하여 획득된 IPT 함유 고추 계통을 농촌진흥청 원예연구소나 종묘회사에 분양하여 엽노화 억제용 품종 육성의 기본 자료로서 이용할 수 있을 것이며, 이에 대한 후속 조치가 요망됨.

## SUMMARY

### Development of anti-senescence variety in hot pepper

We developed the method of gene transformation in hot pepper, and transformed IPT (Isopentenyl Transferase) gene, which was fused with heat shock promoter (hsp), into pimento and hot pepper to increase cytokinin content and delay plant senescence.

In this study, we used *Capsicum annuum* cv. Hyang Chon and Oriental Glory pimento as plant sources, pMON595 as plasmid donated from Monsanto Company, LBA4404 as *Agrobacterium tumefaciens* strain, and HB101 as *Escherichia coli* host.

MS media supplemented with 10 mg/L spermine and various concentrations of zeatin and IAA were experimented with to find the optimum condition for shoot induction, likewise, MS media supplemented with 10 mg/L AgNO<sub>3</sub> and various concentrations of zeatin and IAA for shoot elongation, then various concentrations of kanamycin on each optimum medium for shoot differentiation and shoot elongation were tested for transformant selection.

The procedures for gene transformation in hot pepper was as follows. Hot pepper seeds were sown in MS medium with 12-15 seeds per petri dish, about 10 days after sowing, the cotyledon explant was excised including 1-2 mm petiole at the base for gene transformation, these explants were cultured in MS medium supplemented with 1 mg/L zeatin, 5 mg/L IAA and 10mg/L spermine for 72 hrs as a pretreatment, then immersed in liquid YEP media containing *A. tumefaciens*, 300 mg/L streptomycin and 100 mg/L spectinomycin for 10 min. After that, the explants were cocultured in the pretreated medium containing 100 uM acetosyringone for 2 days, transferred to the pretreated media supplemented with 250 mg/L carbenicillin and 100 mg/L kanamycin for 4 days, and transferred to MS medium containing 2 mg/L zeatin, 0.5 mg/L IAA, 10 mg/L AgNO<sub>3</sub>, 250 mg/L carbenicillin and 100 mg/L kanamycin for shoot induction, induced shoots were transferred to shoot induction medium containing 2 mg/L GA<sub>3</sub> for shoot differentiation and MS media with 10 mg/L spermine, 10 mg/L AgNO<sub>3</sub> and 250 mg/L carbenicillin for shoot elongation orderly. After these procedures, PCR was used to confirm whether the IPT

gene was successfully transformed into the plants or not. We used *nptII* gene as a primer, whose sequences are 5'-GAGGCTATTCGGCTITGACTG-3' and 5'-ATCGGGAGCGGCGATACCGAT-3'.

There were two optimum conditions for shoot and callus induction (IAA 0.5 zeatin 1 - spermine 10 and IAA 0.1 - zeatin 2 - spermine 10) and several optimum combinations of IAA and zeatin for shoot elongation. (IAA 0.5 - zeatin 0.5, IAA 0.5 - zeatin 1, IAA 0.1 - zeatin 2, IAA 0.5 - zeatin 2, and IAA 0.05 - zeatin 4)

After explants, which were transformed with pMON595 containing IPT gene, were transferred to shoot induction medium, 122 out of 443 explants were induced shoots, the percentage of induced shoots was 27.3%.

Transgenic plants were used to do PCR which used *nptII* gene as a primer, 17 out of 20 transgenic plants showed amplified fragment each at 700 bp. This mean approximately 85% of transgenic plants contained IPT gene. Therefore, the result of PCR reaction showed that T-DNA in pMON595 was fused to the nuclear DNA of the transgenic plants.



# CONTENTS

Chapter 1. Introduction	8
Chapter 2. Materials and Methods	10
Chapter 3. Results and Discussion	15
Chapter 4. Literature Cited	34

# 목 차

제 1 장 서 론	8
제 2 장 재료 및 방법	10
제 3 장 결과 및 고찰	15
제 4 장 인용문헌	34

# 제 1 장 서 론

## 1. 연구개발 목표

고추는 우리 나라에서 인구 1인당 연간 고춧가루 소비량은 2kg 정도인데 이는 전세계에서 가장 높은 수준으로, 인구 1인당 고추 재배 면적도 전세계에서 가장 많다.

최근의 UR협상 이후로 다가오는 농산물의 개방화가 우리 농업의 기반을 위협하고 있는 상황에서 농업생산성 향상에 관한 관심의 급격한 증가와, 농업인구의 감소로 인한 인건비 상승과 농업용 자재의 가격 상승은 고추 재배에 있어서도 기계화를 통한 재배 기술의 생력화 요구가 급격히 증대되고 있는 실정이다. 고추의 과실수확시 고추의 불균등한 성숙 및 조기 노화로 인하여 여러 번 수확을 실시하고 있는 것이 현실이다. 또한 과일 고추의 경우는 엽의 조기 낙엽으로 인하여 과피에 직사광선에 의한 엽소현상이 발생하여 상품가치를 떨어뜨리고 있다.

엽 및 과실의 노화는 식물 발육의 한 과정으로, 세포내 함유물의 파괴로 인하여 유발되지만 실제로는 유전적으로 제어된 일정한 경로를 거쳐 특정화학물질 또는 어떤 요인에 의해 나타나는 현상이며, 이 과정은 유전자의 발현, 공간, 광, 영양분, hormone 등의 결합, 온도, 수분 등의 stress, 병원균의 침입 등 다양한 원인에 의하여 발생된다. 특히 엽의 노화 현상은 식물 hormone에 의하여 민감하게 제어된다고 한다. 특히 cytokinin은 식물의 노화(senescence)를 억제하는 획기적인 효과가 있는 것으로 밝혀져 있다.

고추의 조직배양으로는 원형질, 배축 그리고 자엽을 사용한 재분화 및 형질전환 연구가 활발히 진행되어 왔으나(Arroyo *et al.*, 1991; Diaz *et al.*, 1988; Fari and Czako, 1981; Liu *et al.*, 1990; Phillips and Hubstenberger, 1985), 기내에서의 고추의 재분화는 매우 어렵다는 것이 밝혀졌다. 이는 기내에서의 재분화 및 형질전환 체계가 아직 이용할 수 있는 단계가 못되며, 유전적 조작의 적용에는 한계가 있기 때문이다. 따라서 고추에 대한 재분화와 외부 유전자가 발현하는 형질전환 식물의 획득에 대한 심층적 연구가 필요하다.

본 연구에서는 노화 직전의 성엽 및 성과에 cytokinin의 함량을 증대시켜 엽의 노화를

지연시키기 위하여, cytokinin을 생성할 수 있는 유전자를 주변 온도가 38°C 이상일 때 유전자를 발현시키는 heat shock promoter (hsp)와 결합시켜 고추에 형질 전환시킴으로써 포장에서 하절기 고추재배시 고추의 엽 및 과실의 노화를 억제할 수 있는 새로운 신종의 고추품종을 창성하는데 그 목적이 있다.

## 제 2 장 재료 및 방법

### 1. 재료의 준비

본 실험에 사용된 고추 품종은 일반 F<sub>1</sub>고추 향촌과 오리엔탈G 피만을 사용하여 기본 실험을 실시하였으며, 동시에 농진 종묘로부터 분양 받은 일반 고추 내흔계 1403-1, 1404-1, 1418-1, 1445-2, 1450-2, 1467-1 및 피만 고추 내흔계 1902-1과 1903-2를 10립씩 분양 받아 본 연구를 수행하기 위하여 하우스에 파종하여 교배를 실시하였다.

### 2. IPT유전자를 함유한 재조합 plasmid의 분리 및 *Agrobacterium*내 형질전환

#### 가. 실험 재료

본 연구를 수행하기 위하여 IPT 유전자는 Monsanto로부터 공여받은 pMON595 (Medford *et al.* 1989)를 사용하였다 (그림 1). 본 유전자는 Cytokinin 합성 유전자인 IPT의 발현을 위하여 그 앞에 hsp70 promoter가 붙어 있다. 식물체의 형질전환에 사용된 균주는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 사용하였고, 재조합 plasmid의 형질전환용 숙주로는 *Escherichia coli* HB101을 이용하였다.

식물 재료로 고추는 시판 F<sub>1</sub>품종인 일반 고추 향촌과 오리엔탈G 피만을 사용하였다.

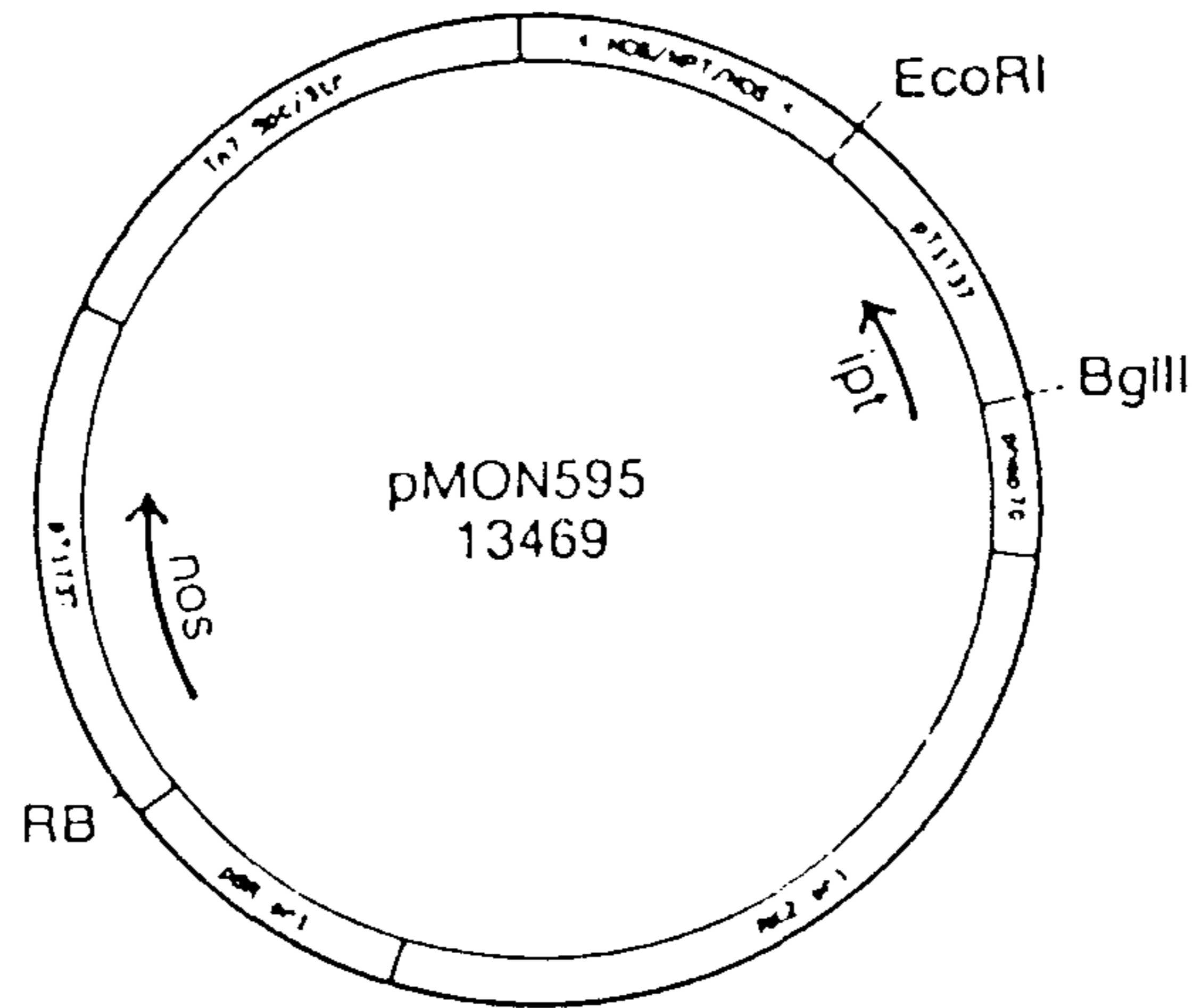


그림 1. pMON595의 제한효소 지도

#### 나. *Agrobacterium* 내의 형질전환

pMON595 유전자를 함유한 재조합 plasmid를 *Agrobacterium* 균주 내로 도입시키기 위해서는 Freeze-thaw method에 의한 direct transformation 방법을, *Agrobacterium* 균주에 삽입된 plasmid DNA 분리 및 확인에는 An(1987)의 방법을 이용하였다.

### 3. 조직배양에 의한 재분화 조건 구명

#### 가. 과종

50개 정도의 고추 종자를 거즈로 싸서 병에 넣고 70% EtOH에 2분간 침적한 후, EtOH을 버리고 0.8% 락스에 Tween 20을 한 방울 떨어뜨려 20분간 흔들면서 소독하고, 멸균수로 5-6회 수세하여 hormone free MS배지에 한 플라스크당 12-15개씩 과종하였다.

## 나. 재분화 조건 구명

과종후 11일째 되는 유묘로부터 얻은 엽병이 1-2mm 정도 붙은 상태로 자엽을 취하여 다양한 농도의 zeatin, IAA, spermine이 포함된 MS 배지에 2주간 배양 shoot의 유도 및 분화를 조장하였다. 그리고 다양한 농도의 zeatin, IAA, AgNO<sub>3</sub>가 포함된 MS 배지로 옮겨 10일 간격으로 계대배양하면서 1개월간 배양한 후, GA<sub>3</sub>가 추가된 배지에서 2주간 배양하여 shoot의 신장을 유도하였다. MS기본 배지에서 뿌리를 유도시켜 완전한 식물체로 분화시켰다.

## 다. Kanamycin농도 조사

과종후 11일째에 유묘로부터 얻은 자엽을 IAA, zeatin, spermine이 1, 2, 10mg/L 포함된 MS 배지에서 24시간 전처리 하고, 멸균수에 5분간 침지한 후, 전처리 배지에 acetosyringone을 100uM 첨가하여 2일간 공조배양했다. 공조배양이 끝난 후 다시 전처리 배지에 kanamycin을 각각 0, 10, 50, 100, 200, 400mg/L씩 첨가하여 재분화때와 같은 조건으로 배양했다.

## 4. 식물체 형질 전환

고추의 유묘로부터 얻은 자엽을 엽병이 1-2mm 정도 포함되게 잘라 zeatin, IAA, spermine이 각각 1, 0.5, 10mg/L 포함된 MS 배지에서 72시간 전처리 배양하였다. LBA4404:pMON595로 형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens*를 streptomycin과 spectinomycin이 각각 300, 100mg/L씩 포함된 YEP배지에서 배양하여 이의 현탁액에 전처리를 거친 자엽을 10분간 침지시켜, acetosyringone 100uM을 첨가한 전처리 배지에 filter paper를 깔고 그 위에 치상하여, 28°C 암상태에서 2일간 공조배양 하였다. 균 접종이 끝나고, filter paper에 20분간 건조시킨 자엽을 carbenicillin (250mg/L)이 함유되어 있는 전처리 배지로 옮겨 7일간 배양한 후, kanamycin (100mg/L)을 첨가하여 4일간 배양하였다. 그리고 shoot의 유도 및 분화는 재분화시와 동일한 배지에 carbenicillin과 kanamycin을 각각 250, 100mg/L씩 첨가하여 배양하였으며, shoot의 신장은 NAA, spermine, AgNO<sub>3</sub>가 각각 0.5, 10, 10mg/L씩 포함된 배지에 carbenicillin과

kanamycin을 각각 250, 200mg/L씩 첨가하여 20일 배양한 후, auxin (IAA)의 농도를 반으로 줄인 배지로 옮겨서 배양하였다.

## 5. 형질전환체의 유전자삽입 여부 확인

### 가. 고추 genomic DNA분리

고추의 DNA를 추출하기 위하여 Dellaporta *et al.* (1984)의 방법을 변형시킨 Urea extraction method를 이용하였다. 조직을 액체질소에서 마쇄 한 후, 400  $\mu$ l의 Urea extraction buffer를 첨가하고 흔들어 섞어 준 후에 800  $\mu$ l의 phenol:chloroform=1:1을 첨가하여 흔들어 주고 15분간 상온에 방치하였다. 15,000rpm으로 10분간 4 ° C에서 원심분리한 후 상등액을 새 tube에 옮기고 이에 40  $\mu$ l의 4.4M ammonium acetate와 240  $\mu$ l isopropanol을 첨가한 후, 50분간 15,000rpm으로 원심 분리하였다. 상등액을 버리고, 75% ethanol을 첨가한 후 다시 3분간 15,000rpm으로 원심 분리하여 salt를 제거하였다. 건조된 pellet에 30  $\mu$ l의 TE를 첨가하고 상온에서 15분간 녹인 후 이를 -20 ° C에 보관하여 사용하였다.

### 나. PCR을 이용한 nptII 유전자의 확인

IPT 유전자의 형질전환 여부를 검토하기 위하여 PCR을 이용하여 nptII 유전자의 존재여부를 확인하였다. nptII primer는 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3'과 5'-ATCGGGAGCGGCGATACCGTA-3'이었다. 본 실험의 PCR은 *Taq* polymerase 1 unit, dNTP 100mM, 5pM의 primer와 50ng의 genomic DNA를 사용하고 PCR program은 처음에 94°C에서 2분간 DNA의 두 가닥을 분리시킨 다음, 94°C에서 15초간, 55°C에서 30초간, 72°C에서 1분 30초간씩 각각 처리하여 DNA를 증폭시키는 것을 1 cycle로 하여, 각 cycle을 45번 반복하여 DNA를 증폭시킨 후, 72°C에서 5분간 안정시킨 다음 4°C에서 유지되도록 하였다. PCR 반응시 반응액표면을 약 20  $\mu$ l의 mineral oil로 피막 처리하여 PCR 반응 도중의 용액 증발을 예방하고자 하였다.

PCR이 끝난 후에 미리 준비된 1.2% agarose gel상에 각 처리 당 12  $\mu$ l씩의 반응



용액을 2  $\mu\text{l}$ 의 gel loading buffer와 잘 혼합하여 loading 한 후 100V에서 약 2시간 30분간 전기영동 하였다. 전기영동 buffer로는 0.5 X TBE를 사용하였다.

전기영동이 끝난 gel은 ethidium bromide(0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 염색한 후 UV transilluminator상에서 DNA band 양상의 관찰 및 사진 촬영을 하였다.

## 제 3장 결과 및 고찰

노화 직전의 성엽 및 성과에 cytokinin의 함량을 증대시켜 엽의 노화를 지연시키기 위하여 cytokinin을 생성할 수 있는 유전자를 주변 온도가 38°C 이상일 때 유전자를 발현시키는 heat shock promoter (hsp)와 결합시켜 고추에 형질 전환시켜 포장에서 하절기 고추재배시 고추의 엽 및 과실의 노화를 억제시킬 수 있는 새로운 고추품종을 창성하기 위하여 본 연구를 실시하였다.

### 1. 재료의 준비

본 유전자의 삽입에 의한 고추의 형질 발현 여부를 검토하기 위하여 고추 F<sub>1</sub>품종인 일반 고추 향촌과 오리엔탈G 피만을 사용하여 기본 실험을 실시하였다. 또한 농진종묘로부터 조직배양이 잘 되는 계통으로 분석된 일반고추 내혼계 1403-1, 1404-1, 1418-1, 1445-2, 1450-2, 1467-1 및 피만고추 내혼계 1902-1과 1903-2를 10립씩 분양 받았다. 그러나 본 실험을 위하여는 위 계통의 종자가 적어도 수백립씩이 필요한 관계로 1-2년 차에 걸쳐 교배를 통하여 증식하였다.

### 2. IPT유전자 함유 binary vector의 *Agrobacterium* 균주 내 삽입

*E. coli* 균주의 IPT유전자 함유 pMON595 binary vector를 *Agrobacterium*균주에 형질 전환시키기 위해 directed transfer mating 방법을 이용하였으며, pMON595 binary vector 함유 *Agrobacterium* LBA4404 내에 freeze thaw method로 도입하였다. pMON595에 대한 항생제 반응 조사를 수행한 결과 LBA4404 conjugant는 spectinomycin 100mg/L, streptomycine 300mg/L를 함유한 YEP배지에서 생존하는 것으로 보아 pMON595가 성공적으로 삽입된 *Agrobacterium* conjugant임이 간접적으로 증명되었다.

배지 상에서 항생제 반응에 의해 선발된 conjugant의 세포내 DNA 함유 여부를 확인

하기 위하여 conjugant로 부터 DNA를 추출하여 제한효소로 절단하여 전기영동한 결과 그림 2에서와 같이 pMON595의 제한효소 pattern이 확인되어 binary vector가 *Agrobacterium*내 성공적으로 삽입되었음을 확인할 수 있었으며 이 균주들을 사용하여 고추의 형질전환 실험을 수행하였다.

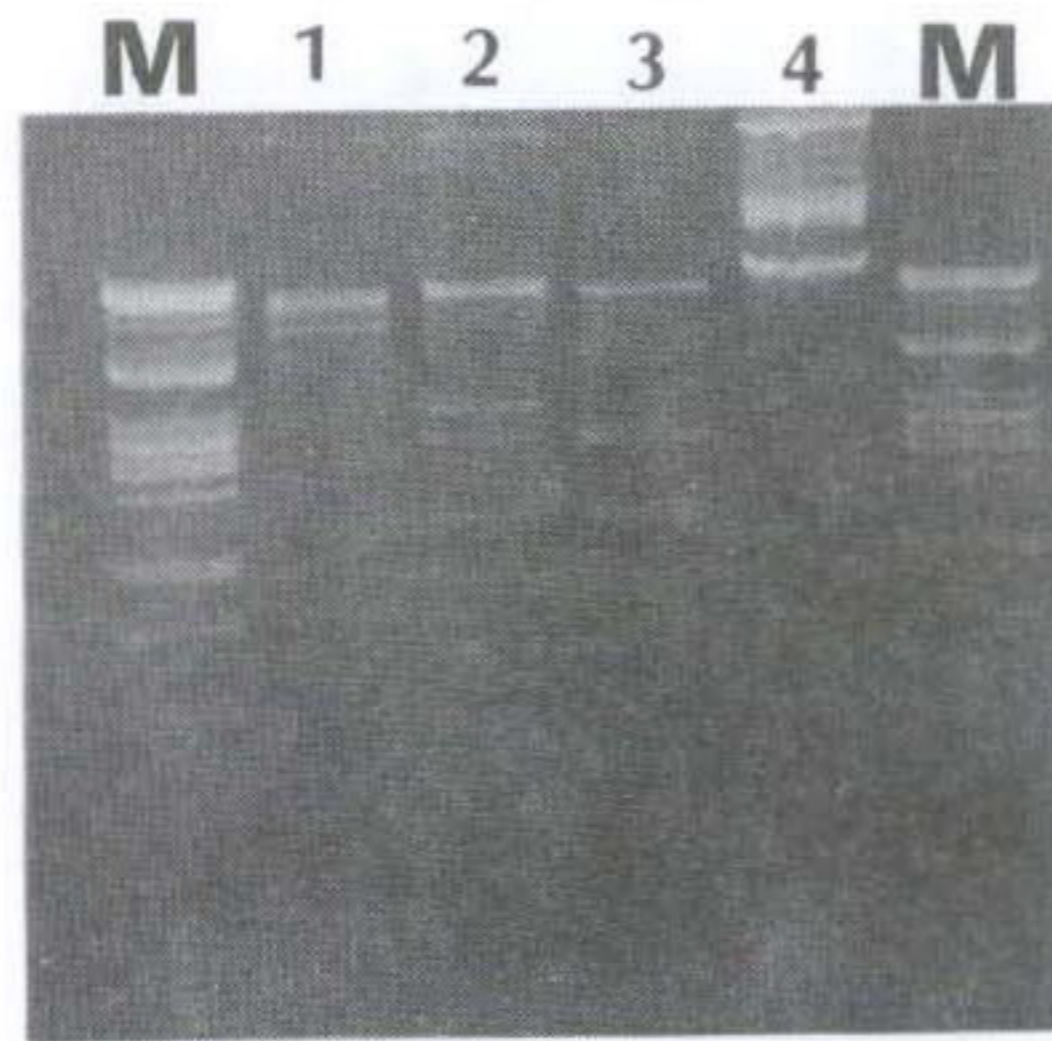


그림 2. IPT유전자 함유 pMON595의 제한효소 절단후 전기영동pattern

lane 1 : uncut pMON595

lane 2 : *EcoRI*, *BglIII* double digested pMON595

lane 3 : *BglIII* digested pMON595

lane 4 : *EcoRI* digested pMON595

### 3. 고추 식물체 재분화 조건 구명

고추의 적정 재분화 조건을 구명하기 위하여 고추 종자를 소독한 후 hormone free MS배지에 한 플라스크당 12-15개씩 파종하였다.

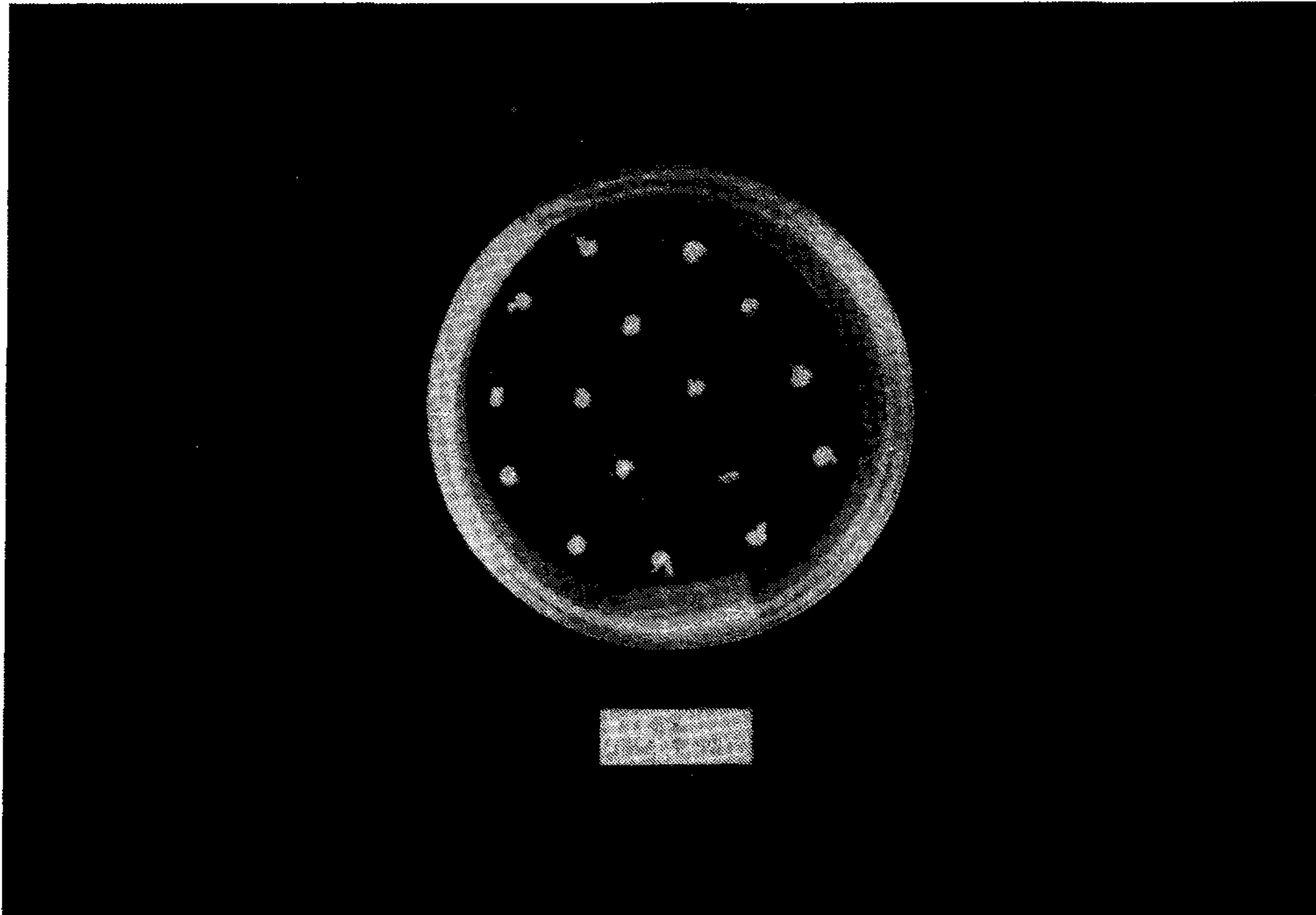


그림 3. 고추(향촌)를 플라스크에 파종한 모습

표 1. 고추 F1 품종 향촌의 식물체 부위별 재분화율

Explant	No. of cultured explant	No. of shooting	No. of rooting
leaf	250	230 (92.0)	215 (86.0)
petiole	180	112 (62.2)	87 (48.0)

과종후 11일째 되는 유묘로부터 엽병을 1-2mm 붙인 상태로 자엽을 취하여, 배지의 zeatin 및 IAA의 적정농도를 확인하기 위하여 zeatin의 농도 각각 0, 0.5, 1, 2, 4 mg/L 와 IAA의 농도 각각 0, 0.1, 0.5, 1, 2 mg/L로 다르게 하여 이들을 조합하여 spermine이 10mg/L 포함된 MS 배지에 2주간 배양하였다 (표 2와 3). 이 결과 낮은 zeatin과 IAA 농도의 조합에서는 주로 callus가 분화되어 나오는 경향이었으며, 고농도 조합의 경우는 조직에 갈변현상이 일어나는 경향이 있었다. 각각 표 1과 표 2를 검토해본 결과, 표 1에서는 IAA 0 - zeatin 2, IAA 0 - zeatin 4, IAA 0.5 - zeatin 1, IAA 0.5 - zeatin 4, IAA 1 - zeatin 2, IAA 2 - zeatin 1의 조성에서 callus 발생율이 가장 높았고, 표 2에서는 IAA 0 - zeatin 2, IAA 0.1 - zeatin 2, IAA 0.05 - zeatin 1의 조성에서 shoot 발생율이 가장 높았다.

위 실험 결과를 분석한 결과와 식물체의 상태를 관찰한 결과 IAA 0.5 - zeatin 1 - spermine 10, IAA 0.1 - zeatin 2 - spermine 10의 두 가지 농도에서 shoot 및 callus가 잘 분화되었다.

표 2. 고추(향촌)의 IAA+zeatin+spermine(10)의 조성에 따른 callus발생률

IAA(mg/L) zeatin(mg/L)	Callus induction ratio(%) (No. of induced calluses/No. of inoculated coleoptiles)				
	0	0.1	0.5	1	2
0	0.0(0/7)	0.0(0/7)	0.0(0/7)	0.0(0/7)	0.0(0/7)
	0.0(0/6)	0.0(0/7)	0.0(0/7)	0.0(0/7)	0.0(0/6)
0.5	85.7(6/7)	0.0(0/7)	85.7(6/7)	85.7(6/7)	0.0(0/7)
	0.0(0/6)	0.0(0/6)	0.0(0/6)	16.7(1/6)	66.7(4/6)
1	85.7(6/7)	0.0(0/7)	100.0(7/7)	85.7(6/7)	85.7(5/7)
	33.3(2/6)	50.0(3/6)	50.0(3/6)	33.3(2/6)	83.3(5/6)
2	71.4(5/7)	85.7(6/7)	0.0(0/7)	77.8(7/9)	0.0(0/7)
	100.0(6/6)	0.0(0/6)	0.0(0/6)	100.0(8/8)	100(6/6)
4	71.4(7/5)	71.4(5/7)	100.0(7/7)	71.4(5/7)	85.7(6/7)
	100.0(6/6)	66.7(4/6)	66.7(4/6)	100.0(6/6)	0.0(0/6)

표 3. 고추(향촌)의 IAA+zeatin+spermine(10)의 조성에 따른 shoot발생률

IAA(mg/L) zeatin(mg/L)	Shoot induction ratio(%) (No. of induced shoots/No. of inoculated coleoptiles)				
	0	0.1	0.5	1	2
0	0.0(0/6)	0.0(0/6)	0.0(0/6)	0.0(0/6)	0.0(0/6)
	0.0(0/7)	0.0(0/7)	0.0(0/7)	0.0(0/7)	0.0(0/7)
	0.0(0/7)	0.0(0/7)	0.0(0/7)	0.0(0/7)	0.0(0/7)
0.5	0.0(0/6)	0.0(0/6)	66.7(4/6)	66.7(3/6)	50.0(3/6)
	0.0(0/7)	0.0(0/7)	14.3(1/7)	0.0(0/7)	0.0(0/7)
	0.0(0/7)	28.6(2/7)	0.0(0/7)	42.9(3/7)	0.0(0/7)
1	0.0(0/6)	0.0(0/6)	66.7(4/6)	100.0(6/6)	16.7(1/6)
	0.0(0/7)	0.0(0/7)	100.0(7/7)	14.3(1/7)	28.6(2/7)
	0.0(0/7)	14.3(1/7)	100.0(7/7)	28.6(2/7)	28.6(2/7)
2	83.3(5/6)	85.7(6/7)	0.0(0/6)	33.3(2/6)	33.3(2/6)
	71.4(5/7)	85.7(6/7)	0.0(0/7)	22.2(2/9)	0.0(0/7)
	85.7(6/7)	100.0(7/7)	0.0(0/7)	33.3(3/9)	37.5(3/8)
4	66.7(4/6)	83.3(5/6)	66.7(4/6)	50.0(3/6)	0.0(0/6)
	71.4(5/7)	25.0(2/8)	0.0(0/7)	28.6(2/7)	85.7(6/7)
	0.0(0/7)	0.0(0/7)	0.0(0/7)	0.0(0/7)	57.1(4/7)

위의 예비 실험을 기초로 하여 고추 shoot의 신장을 위한 IAA 및 zeatin의 적정농도를 확인하기 위하여 IAA 0.1mg/L, zeatin 2mg/L, spermine 10mg/L의 농도에 약 2주간 배양 후 zeatin 농도 각각 0.5, 1, 2, 4mg/L와 IAA 농도 각각 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2mg/L로 다르게 하여 이들을 조합하여 AgNO<sub>3</sub> 10mg/L가 포함된 MS 배지로 옮긴 후 약 20일 후 shoot의 신장 상태를 조사하였다.

표 4에서 보는 바와 같이 IAA 0.5 - zeatin 0.5, IAA 0.5 - zeatin 1, IAA 0.1 - zeatin 2, IAA 0.5 - zeatin 0.5, IAA 0.5 - zeatin 2, IAA 0.05 - zeatin 4의 농도에서 shoot의 신장이 양호하였다.

또한 고추를 IAA 0.5mg/L, zeatin 1mg/L, spermine 10mg/L의 농도에서 위와 같이 실험하였다. 표 4에서 보는 바와 같이 IAA 0.05 - zeatin 0.5, IAA 0.05 - zeatin 1, IAA 0.05 - zeatin 2, IAA 1 - zeatin 2, IAA 0 - zeatin 4, IAA 0.05 - zeatin 4의 농도에서 shoot가 잘 신장되는 것으로 관찰되었다.

표 4. IAA 0.1mg/L, zeatin 2mg/L, spermine 10mg/L의 조성에서 유기된 shoot의 IAA + zeatin + AgNO<sub>3</sub> (10)의 조성에 따른 shoot 신장율

zeatin(mg/L) \ IAA(mg/L)	Shoot elongation ratio(%) (No. of elongated shoots/No. of inoculated shoots)			
	0.5	1	2	4
0	50.0(4/8) 33.3(1/3)	71.4(5/7) 33.3(1/3)	57.1(4/7) 100.0(3/3)	85.7(6/7) 100.0(3/3)
0.05	75.0(6/8) 33.3(1/3)	42.9(3/7) 66.7(2/3)	71.4(5/7) 100.0(3/3)	100.0(7/7) 100.0(3/3)
0.1	87.5(7/8) 66.7(1/3)	57.1(4/7) 100.0(3/3)	100.0(7/7) 66.7(2/3)	85.7(6/7) 100.0(3/3)
0.5	100.0(7/7) 100.0(3/3)	85.7(6/7) 100.0(3/3)	100.0(7/7) 100.0(3/3)	71.4(5/7) 66.7(2/3)
1	85.7(6/7) 33.3(1/3)	57.1(4/7) 100.0(3/3)	57.1(4/7) 66.7(2/3)	71.4(5/7) 100.0(3/3)
2	42.9(3/7) 100.0(3/3)	71.4(5/7) 100.0(3/3)	71.4(5/7) 33.3(1/3)	85.7(6/7) 66.7(2/3)

표 5. IAA 0.5mg/L, zeatin 1mg/L, spermine 10mg/L의 조성에서 유기된 shoot의 IAA + zeatin + AgNO<sub>3</sub>(10)의 shoot 신장률

zeatin(mg/L) IAA(mg/L)	Shoot elongation ratio (No. of elongated shoots/No. of inoculated shoots)			
	0.5	1	2	4
0	42.9(3/7)	71.4(5/7)	50.0(4/8)	100.0(7/7)
0.05	100.0(7/7)	100.0(7/7)	85.7(6/7)	85.7(5/7)
0.1	57.1(4/7)	57.1(4/7)	85.7(6/7)	42.9(3/7)
0.5	42.9(3/7)	85.7(6/7)	75.0(6/8)	71.4(5/7)
1	42.9(3/7)	71.4(5/7)	0.0(0/7)	28.6(2/7)
2	71.4(5/7)	57.1(4/7)	28.6(2/7)	66.7(6/9)



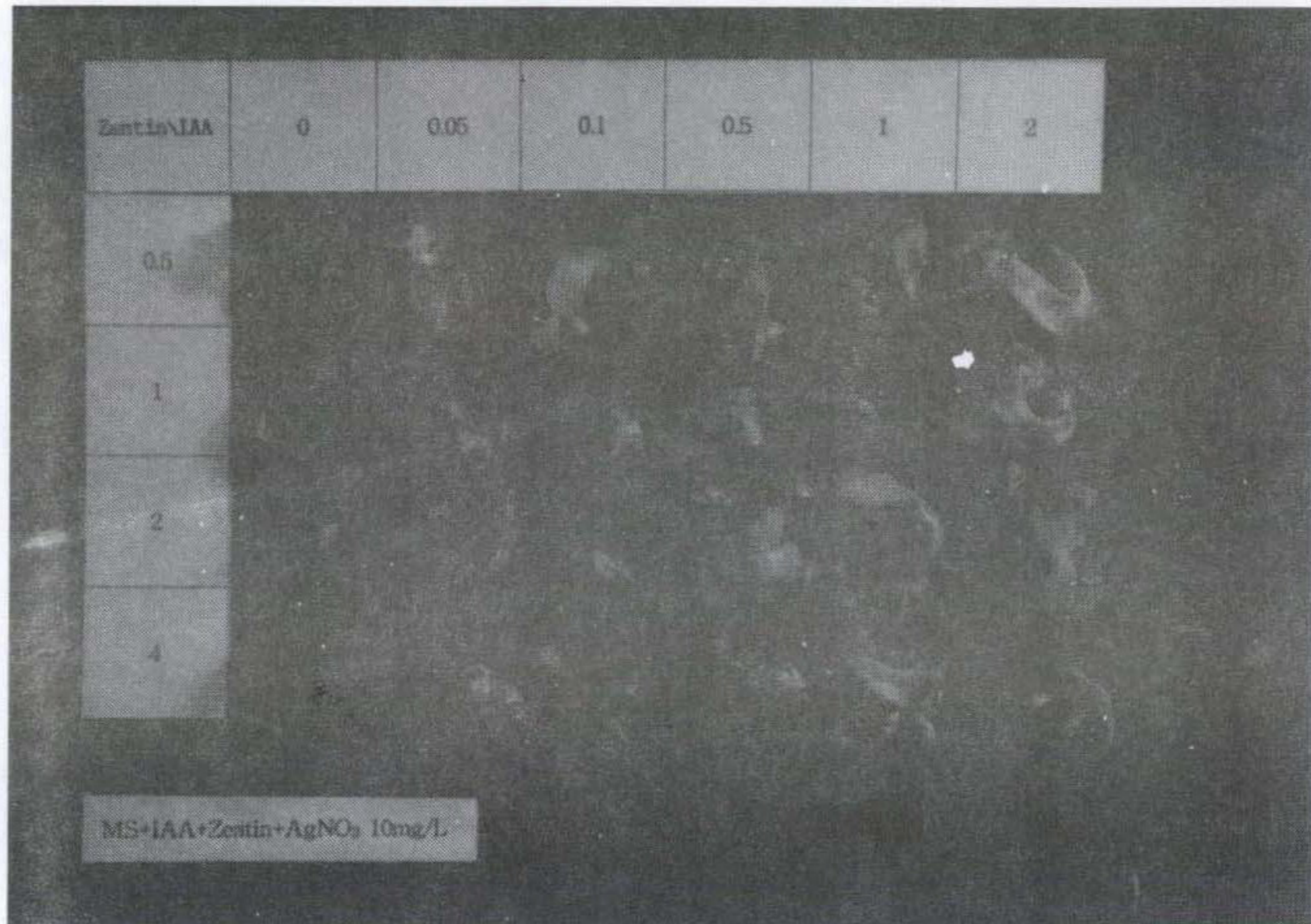


그림 4. 다양한 조성의 IAA + zeatin + AgNO<sub>3</sub> (10)에서의 향촌 품종의 shoot 신장 상태



그림 5.  $\text{AgNO}_3$  10mg/L, spermine 10mg/L에서의 분화된 향촌 품종의 shoot 모습



그림 6. 재분화 실험에 의한 오리엔탈 피만의 shoot가 분화된 모습

#### 4. Kanamycin test

형질전환시 고추 조직의 kanamycin에 대한 저항성 정도를 관찰하여 선발배지에서 형질전환체를 선발하는 조건을 구명하기 위하여 오리엔탈G 피만과 향촌에 대한 kanamycin의 농도별 실험을 실시하였다. 오리엔탈G 피만의 경우 고추 종자의 파종후 11일된 유묘로 부터 얻은 자엽을 IAA, zeatin, spermine을 각각 1, 2, 10mg/L 포함된 MS 배지에서 24시간 전처리하고, 멸균수에 5분간 침지한후, 전처리 배지에 acetosyringone이 100uM 포함된 배지에 2일간 *Agrobacterium*이 없는 상태에서 배양했다. 배양이 끝난 후 다시 전처리 배지에 kanamycin을 각각 0, 10, 50, 100, 200, 400mg/L 씩 첨가하여 재분화와 같은 조건으로 배양했다. 배양한 결과 표 3과 같이 kanamycin 무처리구에서의 shoot형성율은 50ppm 처리구보다 적으나, shoot의 크기 및 분화가 50ppm보다 빠르게 나타났고, kanamycin 10 mg/L처리구에서는 대부분이 callus 형태를 나타내고, shoot형성율이 저조한 편이었다. 50 mg/L처리구에서는 처리구 중 가장 왕성한 shoot형성율을 보이나, 초기에 shoot가 형성되지 않은 것은 검게 변하여 죽었으며, 100 mg/L처리구에서는 shoot 형성은 거의 없고 일부에서 callus가 형성되거나, 양끝이 검게 변했고, 200 mg/L처리구에서는 callus 및 shoot 형성이 전혀 없으며 자엽절취후 60일에는 대부분이 흰색으로 변하여 죽었으며, 400 mg/L처리구에서는 callus 및 shoot 형성이 전혀 없으며 자엽절취후 30일경부터 연한색으로 변하여 50일경에는 완전히 흰색으로 변하여 죽어 버렸다. 향촌의 경우는 오리엔탈G 피만보다 저항성이 약간 약한 것으로 나타나 100mg/L에서 생성되지 않는 경향을 보였다(표 6).

표 6. Kanamycin처리 60일후 shoot 형성율

Km Conc.(ppm)	0	10	50	100	200	400
Oriental G Pimento	+++	++	++++	+	-	-
Hyang Chon	++++	+++	++	-	-	-

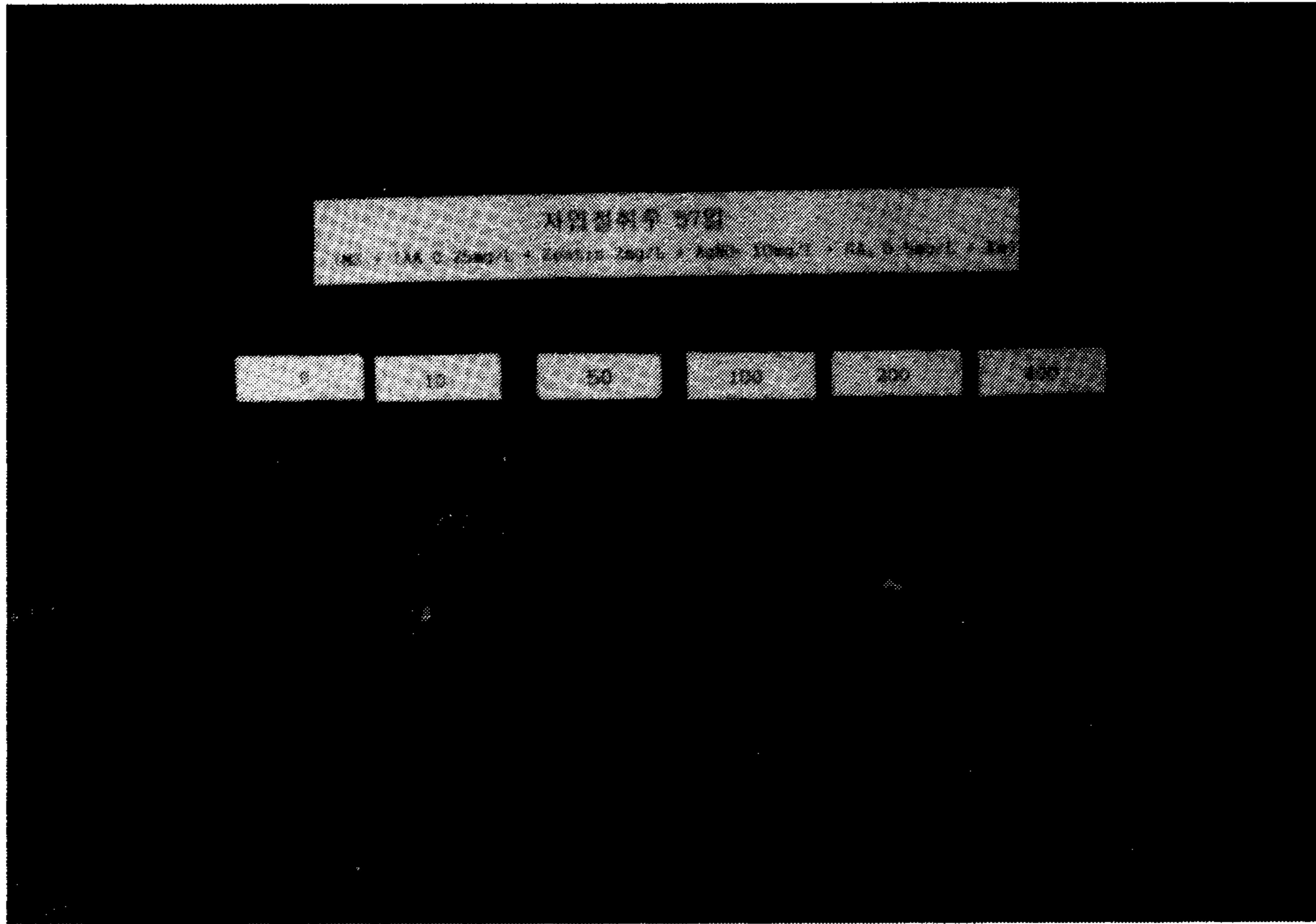


그림. 7 자엽절취 후 57일후 다양한 농도의 kanamycin처리를 한 shoot 형성 상태

## 5. *Agrobacterium*에 의한 식물체 형질전환

고추의 유묘로부터 얻은 자엽을 엽병이 1-2mm 정도 포함되게 잘라 zeatin, IAA, spermine이 각각 2, 1, 10mg/L 씩 포함된 MS 배지에서 72시간 전처리 배양을 한 후, streptomycine, spectinomycine, kanamycin이 각각 300, 100, 100mg/L 씩 포함된 YEP 배지에서 OD<sub>600</sub>이 약 1.0이 되도록 진탕배양한 LBA4404/IPT로 형질 전환된 *Agrobacterium tumefaciens* 현탁액에 전처리가 끝난 자엽을 10분간 침지시켜, acetosyringone 100uM를 첨가한 전처리 배지에 filter paper를 깔고 그 위에 치상하여, 28°C, 암상태에서 2일간 공조배양하였다. 균접종이 끝나고, filter paper에 20분간 건조시킨 자엽을 carbenicillin 250mg/L이 함유되어 있는 전처리 배지로 옮겨 7일간 배양한 후, kanamycin 100mg/L을 첨가하여 2주간 배양하였다. 그리고 shoot의 유도 및 분화는 향촌 재분화시와 동일한 IAA, zeatine, AgNO<sub>3</sub>가 0.5, 2, 10mg/L 포함된 배지에 carbenicillin, kanamycin을 250, 100mg/L 첨가하여 한 달간 배양하였으며, shoot 신장은 NAA, spermine, AgNO<sub>3</sub>가 0.5, 10, 10mg/L 포함된 배지에 carbenicillin, kanamycin을 250, 200mg/L 첨가하여 20일 배양하고, auxin(IAA)의 농도를 반으로 줄인 배지로 옮겨 배양하고 있다.

위와 같은 과정을 거쳐 고추를 pMON595에 transformation시킨 후 형질전환 식물체를 선발한 결과 오리엔탈G 피만을 IPT에 transformation시킨 자엽에서의 shoot 분화율은 22.8%로 나타났다 (표 5). 이와 같은 shoot 분화는 형질전환 처리 후 20일경에 형성되기 시작하여 50일경에는 22.8%의 shoot 분화율을 보였으며, 향촌의 경우 자엽 총개체수 443개에서 분화된 shoot의 수가 122개 나와, shoot분화율이 27.3%이상이었다. 이는 기존에 보고(Lee *et al.*, 1993)된 고추의 형질전환율(4%)과 비교해 볼 때, 대단히 높은 결과임을 알 수 있으나, 유전자의 삽입 여부 및 순화체 획득 단계까지 검토되어야 완전한 형질전환율을 추정할 수 있을 것이다.

표 7. 오리엔탈G 피만 고추와 향촌의 형질전환율

Cultivar	No. of inoculated coleoptiles	No. of induced shoots	No. of elongated shoots
Oriental G Pimento	57 (100)	13 (22.8)	0 (0)
Hyang Chon	443 (100)	122 (27.3)	68 (15.3)

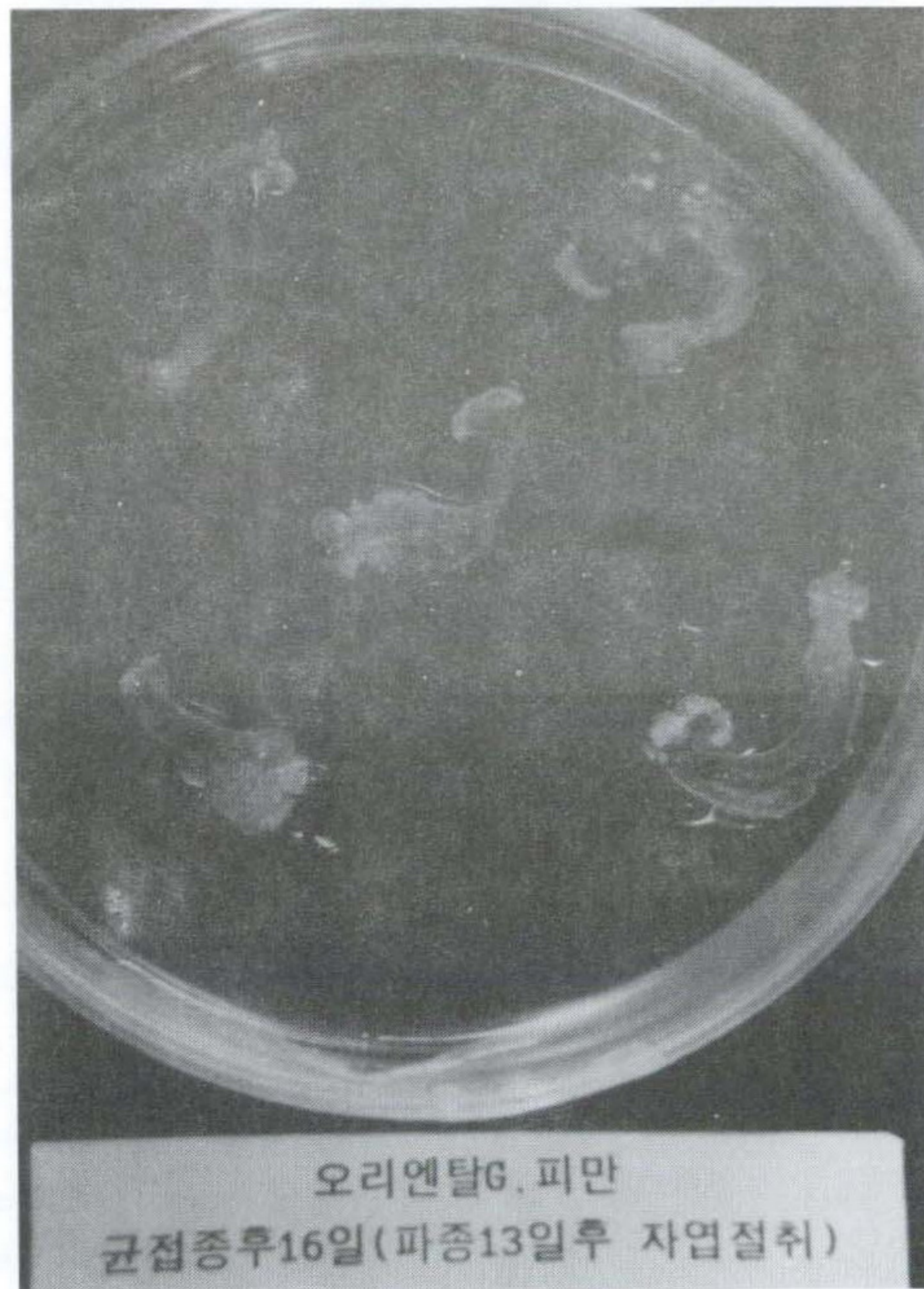


그림 8. 형질전환처리후 16일 후의 오리엔탈 피만 품종의 callus와 shoot가 유기된 모습

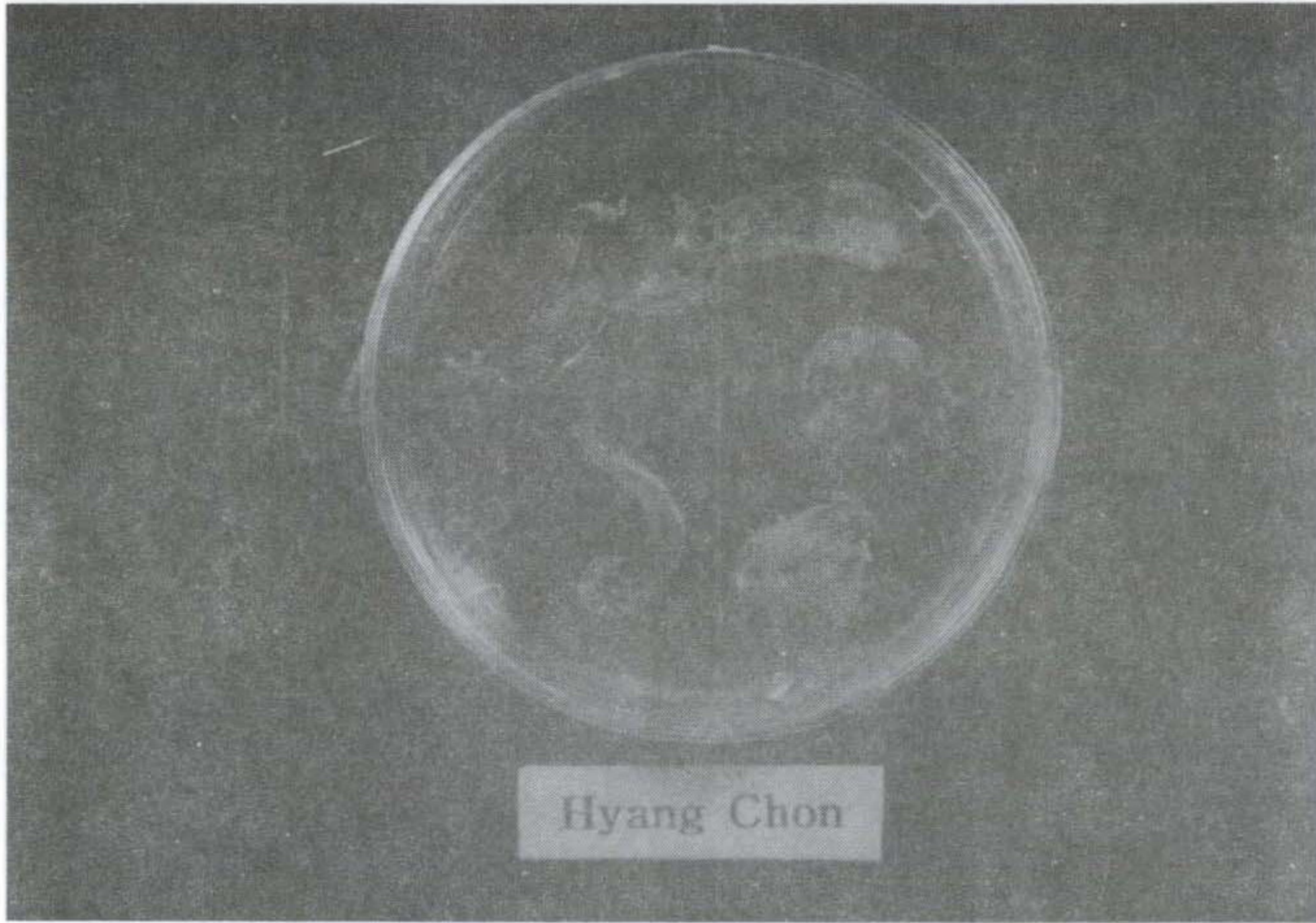


그림 9. 형질전환처리후 60일 후의 향촌 품종의 shooting된 모습



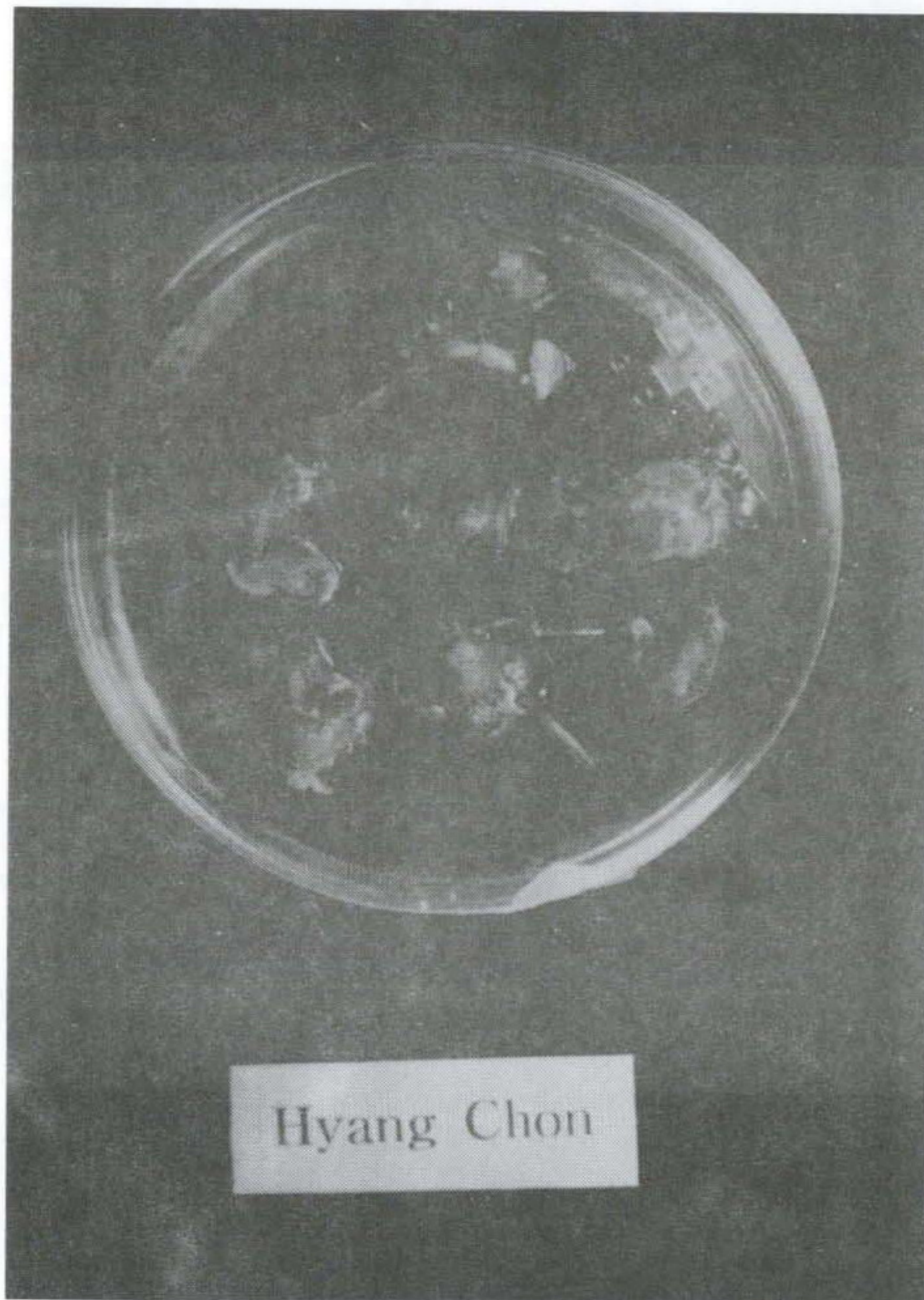


그림 10. 형질전환하지 않은 향촌 품종의 shooting이 되지 않은 모습



그림 11. 형질전환처리후 90일 후의 향촌 품종의 shooting된 모습

## 6. 형질전환 고추의 유전자도입 여부 확인

### 가. 형질전환 식물의 유전자 도입 여부 확인

재분화된 향촌 품종의 식물체 모든 개체로부터 잎을 절취하여 DNA를 분리하였다. 이때 사용된 pMON595 plasmid에는 선발marker로서 kanamycin 저항성 유전자인 neomycine phosphotransferase II (nptII) 유전자를 함유하고 있어 nptII primer를 이용하여 확인하였다.

### 나. nptII 유전자의 PCR을 이용한 확인

형질전환 식물체로부터 DNA를 추출한 후 이에 nptII specific primer를 사용하여 PCR을 수행하였고 PCR이 끝난 후 1.2% agarose gel에 전기영동하여 EtBr로 염색하여 UV조사를 통하여 DNA절편을 확인하였다. control로 사용된 pMON595와 transgenic 고추를 nptII primer로 PCR해 본 결과 형질전환 고추 2- 22(그림 12 lanes 2-22)중 17개 개체에서 700 bp의 위치에서 1개의 band가 나타남이 확인되어 nptII primer로 형질전환된 개체가 약 85%정도인 것이 확인되었다. 이는 pMON595의 T-DNA내에 존재하는 nptII gene이 식물체내의 핵 DNA내에 성공적으로 삽입되었음을 보여주었다.

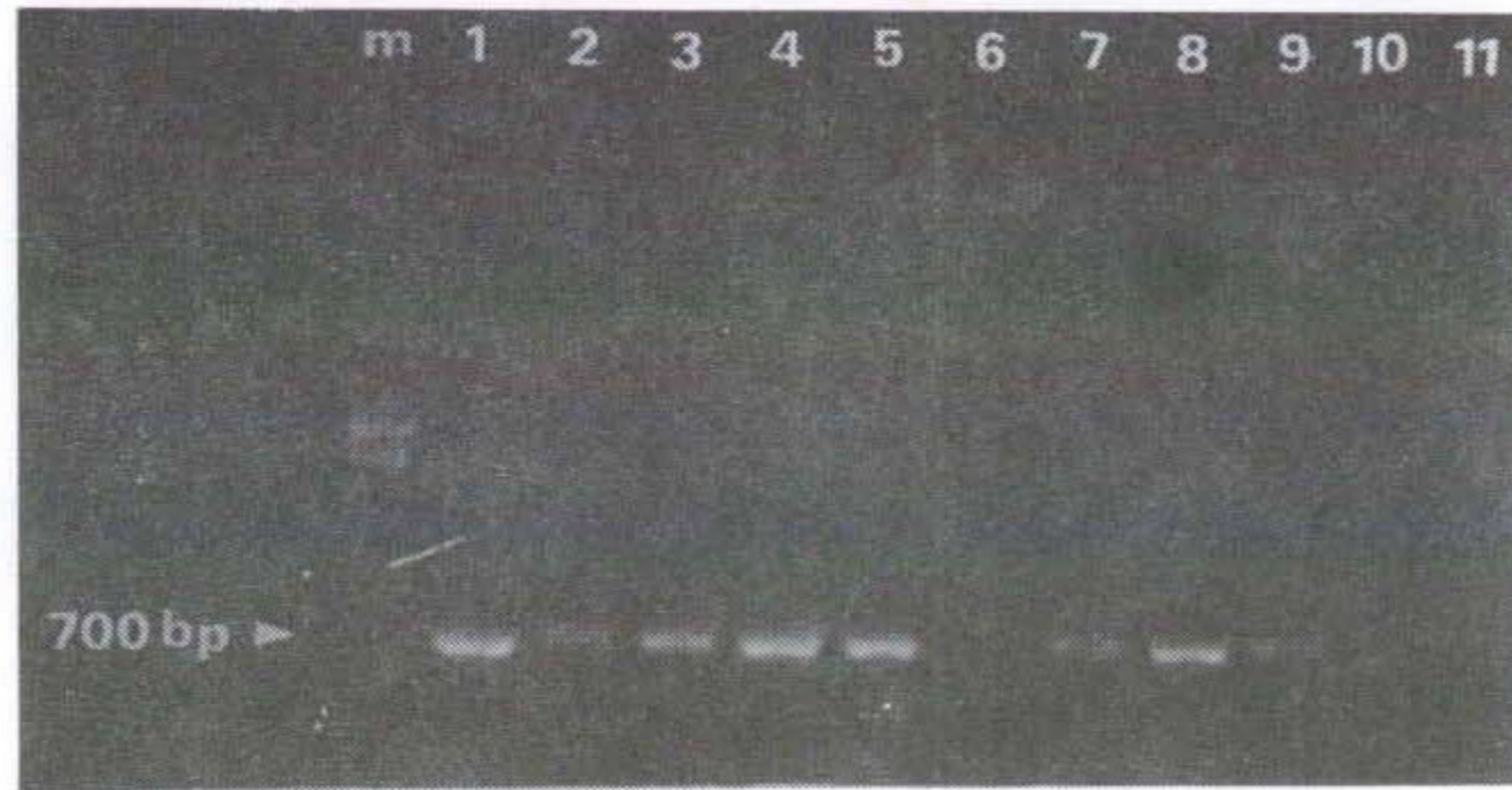


그림 12. 형질전환 식물의 nptII 유전자의 PCR 밴드양상

Lane M. DNA marker

Lane C. Non-transgenic plant

Lane 1. pMON595 plasmid

Lanes 2-22. Transgenic plant

## 제 4장 인용문헌

- An, G. (1987) Binary Ti vector for plant transformation and promoter analysis. In Methods in Enzymology 153. pp. 292-305.
- Arroyo, R. and Revilla, M.A. (1991) In vitro plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars. Plant Cell Reports 10: 414-416.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., and Hicks, J.B. (1984) A microscale plant DNA isolation procedure. Plant Molecular Biology Reporter 1: 2.
- Diaz, I., Moreno, R., and Power, J.B. (1988) Plant regeneration from protoplasts of *Capsicum annuum*. Plant Cell Reports 7: 210-212.
- Fari M. and Czako, M. (1981) Relationship between position and morphogenetic response of pepper hypocotyl explants cultured in vitro. Scientia Horticulturae 15: 207-213.
- Lee, S.J., Kim, B.D., and Paek, K.H. (1993) In vitro plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from cotyledon explants of hot pepper. Korean J. Plant Tissue Culture 20: 289-294.
- Liu, W., Parrot, W.A., Hildebrand, D.F., Collins, G.B., and Williams, E.G. (1990) *Agrobacterium* induced gall formation in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and formation of shoot-like structures expressing introduced genes. Plant Cell Reports 9: 360-364.
- Medford, J.I., Horgan, R., El-Sawi, Z., and Klee, H.J. (1989) Alterations of Endogenous Cytokinins in Transgenic Plants Using a Chimeric Isopentenyl Transferase Gene. The Plant Cell 1: 403-413.
- Phillips, G.C. and Hubstenberger, J.F. (1985) Organogenesis in pepper tissue cultures. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 4: 261-269.