최 종
연구보고서

고품질 만주대성 무 품종개발에 관한 연구

Studies on Development of High quality late flowering Cultivars of Radish(*Raphanus sativus L.*)

포 항 공 과 대 학 교

농 림 부

최 종 보 고 서

2000년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 “고품질 만추대성 무 품종개발”에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부
2. 최종보고서 디스켓 1매

2000. 12. 20.

주관연구기관 : 포항공과대학

총괄연구책임자 : 남 홍 길 (인)

주관연구기관장 : 포항공과대학총장

농 림 부 장 관 귀하

제 출 문

농 림 부 장 관 귀 하

본 보고서를 “고품질 만추대성 무 품종개발” 의 최종보고서로 제출합니다.

2000. 12. 20.

주관연구기관명 : 포항공과대학
총괄연구책임자 : 남 홍 길
연 구 원 : 임 학 태

최 종 보 고 서 초 록

<table>
<tr><td rowspan="2">과 제 명</td><td colspan="4">(국문) 고품질 만추대성 무 품종개발</td></tr>
<tr><td colspan="4">(영문) Development of High Quality Late Flowering Cultivars of Radish(Raphanus sativus L.)</td></tr>
<tr><td>주관연구기관</td><td colspan="2">포 항 공 과 대 학 교</td><td>총괄연구
책 임 자</td><td>(소속) 생명과학과
(성명) 남 홍 길</td></tr>
<tr><td>참 여 기 업</td><td colspan="2">없 음</td></tr>
<tr><td rowspan="4">총연구개발비</td><td>계</td><td>600,000 천원</td><td>총연구기간</td><td>1995. 12. 2000. 12.
(5 년)</td></tr>
<tr><td>정부출연금</td><td>480,000 천원</td><td rowspan="3">총 참 여
연구원수
(명)</td><td rowspan="3">총 12 명
(내부 10 명)
(외부 2 명)</td></tr>
<tr><td>정부이외의
출 연 금</td><td></td></tr>
<tr><td>기업체 부담</td><td>120,000 천원</td></tr>
<tr><td colspan="5">□ 연구개발목표 및 내용
본 연구 개발의 최종목표는

□ 연구성과
제1과제에서는. 제2과제에서는.

□ 연구성과 활용계획</td></tr>
</table>

요 약 문

I. 제목

고품질 만추대성 무 품종개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

가. 연구개발의 목적

. 유전공학적 기법을 이용한 양질의 만추대성 무 품종의 개발
. 잡종종자 검정법 개발
. 분자표지 지도 개발

나. 연구개발의 중요성

1. 국내의 중요한 채소작물의 하나인 무는 조기추대 현상에 의해 봄무의 경우 꽃이 일찍 피어 가을무에 비해 품질이 떨어지는 문제점을 안고 있음, 따라서 양질의 고품질 무 개발이 필요함.
2. 고전 육종에 의한 만추대성 도입은 multigene 도입에 의해 고품질을 유지하기 어려움.
3. 현행 무 잡종 종자의 검정은 주로 동위 효소를 사용하고 있으나 효율성과 정확성에 문제가 있음.
4. 고전 육종으로는 무 육종시 장기간이 소요되어 다양한 기호 및 시장성 변화에 적극적으로 대체하기 어려움. 따라서 분자표지를 확보하여 고전 육종기술을 보완할 필요가 있음
5. 연구개발과정을 통하여 축적되는 유전자원 및 형질전환체 확립기술을 이용하여 새로운 형질을 갖는 식물체를 개발하는데 기여할 것임.

III. 연구개발의 내용 및 범위

가. 추대성 조절유전자의 분리 및 유전자 조작

AtGI와 RsCO의 동정하여 plant expression vector에 cloning.

나. 무의 형질전환 기법 확립

. Floral dipping 방법에 의한 형질전환.

. In planta 방법에 의한 형질전환.

다. 형질전환체 분석 및 표현형 조사

. GUS 유전자에 의한 발색반응 분석.

. Southern blot analysis : 유전자의 도입 여부 조사.

. Anti-GI 도입 식물체의 bolting 시기 조사.

라. 잡종종자 검정법 개발

GUS 유전자 도입식물을 이용한 잡종종자 검정법 확립

마. 분자표지 지도의 작성

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발결과

1. 애기장대로부터 추대성 관련 유전자인 Gigantea(GI)를 map based cloning 방법으로 cloning. GI 유전자는 생체시계와의 연관성을 밝힘. 이를 pCAMBIA 3301 vector에 sense 및 antisense 방향으로 cloning 함. 무로부터 애기장대의 CO 유전자의 homologue인 RsCO를 RT-PCR방법으로 분리함. RsCO를 pCAMBIA 3301 vector에

antisense 방향으로 cloning 하였다.

2. Floral dipping 및 in plant 형질전환법의 비조직배양적 형질전환법을 확립함. 형질전환 2세대에서 southern blot 분석을 실시하여 도입된 유전자가 안정적으로 후대전승 함을 밝힘.

3. 무에서 GI 유전자의 antisense suppression에 의한 개화 지연효과를 확인하였음. 7종의 형질전환 2세대 식물, 각 64개체를 대상으로 bolting tine을 측정한 결과 추대 형성이 상당한 수준으로 지연되었음.

4. 후대전승이 한정적인 GUS 유전자 및 basta 저항성 유전자를 도입한 무에 도입함. 이를 통한 잡종종자 검정이 가능하도록 하였음.

5. 72개의 분자마커를 이용하여 무의 분자표지 지도를 개발하였음.

2. 활용에 대한 건의

1. 무와 같은 십자화과인 애기장대로부터 추대성 관련 유전자인 Gigantia(GI)를 cloning 하고 기능을 밝혔음. 이는 추대를 조절하고자하는 다른 작물에도 적용할 수 있을 것으로 사료됨

2. Late flowering 형질을 보이는 형질전환 무를 직접 이용하거나 모본으로 하여 타 품종의 개량에 이용할 수 있을 것이다.

3. 비 조직배양법을 이용한 새로운 형질전환 체계를 확립은 무에 기타형질의 도입이 가능케하는 파급효과를 주어 무의 품종개량을 가속화 할 것이다. 또한 조직배양이 어려운 타 작물에도 이 기술을 적용할 수있을 것으로 사료된다.

3. GUS 유전자 및 basta 저항성 유전자를 도입한 무를 모본이나 부본으로 이용함으로서 손쉬운 잡종종자 검정법 확립에 활용할 수있다.

5. 만들어진 분자표지 지도는 무의 전통적 육종에 의한 품질 개량의 가속화에 이용될 수있다.

Summary

(영 문 요 약 문)

I. Title

Development of high quality late flowering cultivars of radish.

II. Objective and Significance of the research

A. Objective

. Development of high quality late flowering cultivars of radish by genetic engineering

. Development of a methodology for confirm hybrid seeds or not

. Development of a molecular map

B. Significance

1. Early flowering of radish spring cultivar affect a major economic problem through reduction in quality. Therefore, there is a strong need to develop late flowering in radish
2. It is difficult to maintenance high quality by the classis plant breeding methodology because flowering related gene is closely linked with undesirable characteristics, or they can be polygeinc in nature

3. Isozyme analysis are typically used in present technique for screening of radish heterotype seeds but they have a limitation of effectiveness and accuracy.

4. Conventional applied to the radish breeding requires long time and thereby has molecular map has to be added to the procedure in order to improve the conventional method.

5. The transformation techniques through this research processes will contribute to

developing new genetically modified plant.

III. The scope and Content of the Research

A. Isolation of flowering time regulatory genes and genetic manipulation.

Isolating AtGI and RsCO followed by cloning with plant expression vectors.

B. Set up the transformation technique of radish.

Transformation using floral dipping method

Transformation using in planta method

C. Analysis of transformant and check on their phenotypes.

Histochemical analysis using GUS genes

Southern blot analysis : check on gene introduction into chromosome or not.

Examining bolting time of Anti-GI introduced plants

D. Method Development for screening heterotyped seeds

Set up the screening method of heterotyped seeds using GUS and herbicide resistance gene in transformed plants

E. Development of Molecular map

IV. Results and Application

1. Result

1. Revealed the relationship between GI gene and circadian clock by cloning flowering time related gene, Gigantea(GI) from *arabidopsis* using map based cloning method. Cloned with pCAMBIA 3301 vector in both sense and antisense direction. Isolated RsCO, a CO gene homologue of arabidopsis, from radish using RT-PCR. Cloned RsCO with pCAMBIA 3301 vector in antisense direction.

2. Sep up the transformation method that comprises floral dipping and *in planta* transformation without tissue culture. Revealed that the introduced gene with this method is inherited in stable manner by southern blot analysis.

3. Confirmed that GI gene has an effect to delay flowering time in radish through

antisense suppression. Measurement of bolting time in 64 plants from each 7 T2 plants showed significantly delayed phenotype.

4. introduced GUS gene that is consistent inherited to posterity and basta resistnant gene into introduced radish. This makes possible screening heterotyped seeds.

5. Developed molecular map using 72 of molecular markers.

목 차

Contents

제 1 장 서론

무는 김치의 주 재료로서 우리 국민 식생활에 필수적인 중요한 채소이다. 1995년 재배면적이 35,518 ha로 채소 전체 면적의 8.8%, 생산량은 1,435,296 M/T로 전체 채소 생산량의 13.6%를 차지하고 있다. 그러나 현재 재배되는 봄무의 경우 꽃이 일찍 피어 가을무에 비해 품질이 떨어지는 문제점을 안고 있다. 과거에는 이러한 문제점의 해결은 추대성을 비롯한 무의 품질 향상은 교배를 통한 전통적 육종방법에 의해서 이루어져 왔으나 최근에는 유용한 유전자원의 고갈, 교배를 통한 변이 창성의 한계, 긴 육종 연한 등 전통적인 육종의 한계를 극복하기 위한 새로운 시도로서 유전공학 기법이 무의 개량에 도입되고 있으며 관행 육종에서 만추대성 도입시 기타 형질이 같이 도입되고, 또한 개발된 품종의 추대성이 안정되지 못하므로 품질을 유지하면서 안정된 만추대성 도입을 위해 유전공학적 기법의 도입 필요성이 더욱 크다 할 수있다..

본 연구에서는 양질의 만추대성 무 품종을 육성하기 위하여 유전공학 기법을 이용한 양질의 만추대성 봄무 품종육성, 발색 유전자의 도입으로 잡종종자의 순도검정이 용이한 무 품종 개발, 무 분자표지 지도의 작성의 세 가지 접근 방법을 사용하였다. 그러나 전자의 두 가지 접근 방법은 추대성 조절유전자의 확보 와 효율적인 형질전환 방법을 필요로 한다.

추대성은 여러 가지 환경 및 발생에 따라 민감하게 작용하여 대개의 작물에서는 그 정확한 유전기작 연구가 되지 않았으나 최근 *Arabidopsis*에 대해서는 그 유전연구가 활발히 진행되어 있다. 현재 *Arabidopsis* 에서는 적어도 13개의 만추대성 돌연변이가 분리되어 있으며, 식물의 개화 과정의 이해에 큰 진전을 보이고 있다. 이들은 생리, 생화학적 연구를 통해 3개의 group으로 나누어져 있으며, 이들 만추대성 변이의 원인은 대부분의 경우 단순한 생장 저하가 그 원인이 아니고 영양생장으로부터 생식생장으로의 전환 시기에 문제가 있기 때문인 것으로 밝혀졌다. 13개의 만추대성 돌연변이는 광주기와 춘화처리에 대한 response와 doulble mutant analysis에 의해 크게 3개의 group으로 나눌 수 있다. fca, fpa, fve와 fy mutant는 짧은 춘화 처리에 의해 개화 시기가 2-4배 단축되고, 장일 조건과 단일 조건에서 모두 만추대성 현상을 보이는 특징을 가지고

있다. 이에 반해 fe, ft, fd 와 fwa는 광주기에 대한 response는 앞의 돌연변이 group과 동일하지만 춘화 처리에 의해 개화 시기가 거의 영향을 받지 않는다. 그리고 co 와 gi 돌연변이는 춘화처리나 생장호르몬 등에 영향을 받지 않으며, 장일 조건에서만 개화시기가 3-5배 늦어지는 특징을 가지고 있다.

따라서 본 연구에서는 Arabidopsis의 GI와 Radish의 CO 유전자를 cloning하고 비조직배양적 형질전환 기법을 개발하여 antisense 기술로서 무에서 GI와 CO 유전자의 발현을 억제함으로서 만추대성 도입을 시도하였다.

제 2 장 연 구 추 진 방 법

1. 무 CONSTANS(RsCO) gene cloning 및 antisense expression vector 작제

1) RsCO의 RT-PCR cloning

*Arabidopsis*의 *co* 유전자에서 유래된 primer를 이용하여 무의 CONSTANS-homologue PCR product를 얻었다. 무의 게놈 RNA를 phenol-chloroform extraction 방법으로 전제한 후 ethanol 침전시켜 분리하였다. 분리된 무의 total RNA(0.5μg)로부터 FIRST cDNA를 합성하기 위해 3‘ 말단에 대응하는 primer와 Time Saver cDNA synthesis kit (Pharmacia Co.)을 사용하였고 생성된 RNA-cDNA douplex로부터 CONSTANS-homologue 유전자를 증폭하기 위해 ExTaq(TaKARA Co.)와 5’말단 및 3‘말단에 대응하는 primers를 첨가하여 PCR을 수행하였다. PCR은 DNA thermal cycler(Perkin-Elmer Co.)을 사용하여 denaturation (94℃, 1분), annealing(55℃, 1분), polymerization(72℃, 2분)의 cycle을 30회 반복하였고 최종 중합반응으로 10 반응시켰다.

무의 게놈 RNA를 대상으로 RT-PCR을 수행하여 얻어진 PCR product는 Promega Co. pGEM T-easy vector의 3‘-T overhang에 연결하여 재조합 plasmid를 만들고 *Escherichia coli* TOP10을 숙주로 하여 형질전환을 유도하였다. 형질전환은 Cohen et al. 의 방법에 따라 competent cell을 만들어 사용하였다. PCR product가 삽입된 재조합 plasmid를 갖고 있는 형질전환체 선별은 β-galactosidase 활성을 이용한 α-complementation과 ampicillin 저항성을 이용하였다. 이렇게 얻어진 재조합 plasmid는 DNA 염기서열 결정을 위한 주형으로 사용하였다.

2) RsCO의 염기서열 결정 및 분석

DNA 염기서열 결정은 Sanger의 dideoxy chain termination 방법을 바탕으로 Parmacia Co. ALFTM express autocycle sequencing kit 제품과 pGEM T-easy vector의 M13 forward/Reverse sequencing primer binding site를 이용하여 양방향으로 염기

서열을 결정하였다.

DNA 염기서열 분석은 염기서열 분석 프로그램인 DNASIS(Hitachi Software Engineering Co. Ltd)을 사용하여 정리하였고, 염기서열의 상동성 검색을 위해 미국의 NCBI에서 제공하는 Blastn과 Blastx를 이용하였다. 이외에도, Genebank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)와 EBI (http://www.ebi.uk)에 구축된 염기서열 database를 상동성 검색에 이용하였다

3) RsCO antisense 발현 벡터의 작제

증폭된 DNA를 *EcoR* V로 절단한 후 CaMV35S promoter-NOS terminator를 가지고 있는 Shuttle Vector pCAMBIA 3301의 GUS 유전자 말단에 있는 *Pml* I site에 ligation 한 후 CaCl2 방법으로 만들어진 *E.coli* TOP 10 competent cell에 heat shock (42℃ 1분) 처리하여 형질전화 시켰다. 형질전환체는 ampicillin (50㎍/㎖)을 포함하는 LB plate에서 16시간 배양하여 선별하였다. 형질전환된 colony로부터 plasmid를 분리하여, *Pst* I으로 절단 후 agarose gel 전기영동으로 RsCO 유전자가 antisense 방향으로 삽입된 것을 확인하였다. 획인 된 plasmid를 electroporation 방법으로 *Agrobacterium tumefacience* AGL1에 형질전환하였다.

2. *gi* gene cloning 및 antisense expression vector 작제

1) *gi* map-based cloning

gi gene의 cloning은 map-based cloning 방법을 통하여 수행하였다. *gi* locus와 F2 progeny 1000개 이상에서도 recombination이 일어나지 않는 가까운 genetic marker인 *th*1 gene을 포함하는 *Arabidopsis* YAC library, BAC library, cosmid library clone을 Stanford 대학에 위치한 Arabidopsis stock center에서 분양 받았다. *th*1 유전자가 위치한 것으로 알려진 F19G10 BAC clone을 중심으로 T26J12, T22J18,의 contig를 작성한 후 이후의 RFLP 실험에 이용하였다.

X-ray에 의해 유도된 deletion mutant인 *gi*-1 및 *gi*-2 와 야생형 *Arabidopsis*인 Columbia로부터 total genomic DNA를 Dellaporta(1983)의 방법으로 추출하였다.

F19G10, T26j12, T22J18의 세 종의 BAC contig와 추출한 세 종의 genomic DNA를 다양한 조합의 제한 효소로 절단 한 후 0.7% agarose gel에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 DNA가 있는 젤을 진공을 건 상태에서 0.25N HCl용액으로 20분 간, 변성용액 (1.5M NaCl, 0.5N NaOH)으로 동일한 시간 각각 처리한 후, 이를 다시 중화용액 (0.5M Tris pH 7.0, 1.5M NaCl)으로 동일한 시간을 처리한 후 마지막으로 2X SSC (NaCl 17.53g/l, sodium citrate 8.2g/l, pH 7.0)로 10분 처리함으로서. neutral nylon membrane (S&S) 으로 DNA를 옮기고 80℃에서 2시간 baking 하였다.

혼성화 반응은 DNA가 전이된 membrane을 혼성화 용액 (7% SDS, 1% BSA, 1mM EDTA, 0.5M sodium phosphate buffer pH 7.2)에 탐침 DNA를 함께 넣고 수행하였다. 탐침 DNA는 *BamH* I 으로 절단된 3종의 BAC DNA를 rediprime kit (Amersham)을 이용하여 ^{32}P 동위원소로 표지 하였다. 15시간 동안 혼성화 반응 후, 상온에서 세척용액 (0.1% SDS, 1X SSC)으로 두 번 반복해서 씻은 후 X-ray film에 3일에서 5일간 노출 후 현상하였다.

2) *GI* 유전자의 PCR cloning

RFLP 분석결과와 A*rabidopsis* 염기서열 database를 이용하여 GI 유전자로 예상되는 부분의 primer를 설계하고 이를 이용하여 게놈 DNA로부터 GI 유전자를 PCR 하였다. 무의 게놈 DNA를 Dellaporta 방법으로 정제한 후 ethanol 침전시켜 분리하였다. 분리된 무의 DNA(0.1μg)로부터 GI-candidate 유전자를 증폭하기 위해 ExTaq(TaKARA Co.)와 5'말단 및 3'말단에 대응하는 primers를 첨가하여 PCR을 수행하였다. PCR은 DNA thermal cycler(Perkin-Elmer Co.)을 사용하여 denaturation (94℃, 1분), annealing(55℃, 1분), polymerization(72℃, 2분)의 cycle을 30회 반복하였고 최종 중합반응으로 10 반응시켰다.

Arabidopsis 게놈 DNA를 대상으로 PCR을 수행하여 얻어진 product는 Promega Co. pGEM T-easy vector의 3'-T overhang에 연결하여 재조합 plasmid를 만들고 *Escherichia coli* TOP10을 숙주로 하여 형질전환을 유도하였다. 형질전환은 Cohen et al. 의 방법에 따라 competent cell을 만들어 사용하였다. PCR product가 삽입된 재조합 plasmid를 갖고 있는 형질전환체 선별은 β-galactosidase 활성을 이용한

α-complementation과 ampicillin 저항성을 이용하였다. 이렇게 얻어진 재조합 plasmid는 DNA 염기서열 결정을 위한 주형으로 사용하였다.

3) GI의 염기서열 결정 및 분석

DNA 염기서열 결정은 Sanger의 dideoxy chain termination 방법을 바탕으로 Parmacia Co. ALFTM express autocycle sequencing kit 제품과 pGEM T-easy vector의 M13 forward/Reverse sequencing primer binding site를 이용하여 양방향으로 염기서열을 결정하였다. DNA 염기서열 분석은 염기서열 분석 프로그램인 DNASIS(Hitachi Software Engineering Co. Ltd)을 사용하여 정리하였고, 염기서열의 상동성 검색을 위해 미국의 NCBI에서 제공하는 Blastn과 Blastx를 이용하였다. 이외에도, Genebank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)와 EBI (http://www.ebi.uk)에 구축된 염기서열 database를 상동성 검색에 이용하였다

4) GI antisense 발현 벡터의 작제

증폭된 DNA를 *EcoR* V로 절단한 후 CaMV35S promoter-NOS terminator를 가지고 있는 Shuttle Vector pCAMBIA 3301의 GUS 유전자 말단에 있는 *Pml* I site에 ligation 한 후 CaCl2 방법으로 만들어진 *E.coli* TOP 10 competent cell에 heat shock (42℃ 1분) 처리하여 형질전화 시켰다. 형질전환체는 ampicillin (50㎍/㎖)을 포함하는 LB plate에서 16시간 배양하여 선별하였다. 형질전환된 colony로부터 plasmid를 분리하여, *Pst* I으로 절단 후 agarose gel 전기영동으로 RsCO 유전자가 antisense 방향으로 삽입된 것을 확인하였다. 획인 된 plasmid를 electroporation 방법으로 *Agrobacterium tumefacience* AGL1에 형질전환하였다.

3. 비 조직배양 방법에 의한 형질전환

1) 식물 재료 및 생육조건

본 실험에서 사용된 무는(*Raphanus sativus* L.) 진주대평(경신 종묘) 품종을

사용하였다. .vermiculite, peat moss, pearlite.가 2:1:1의 비율로 혼합된 인공 토양에 파종하여 22℃±1℃의 장일 조건(16시간 낮/8시간 밤)이 조절되는 온실에서 생육 시켰다.

추대를 위해서는 4℃, 장일 조건이 조절되는 인공배양기에서 10일간 저온 저리하였다.

2) 정단분열 조직의 상처부위에 *Agrobacterium*의 *in planta* 접종에 의한 형질전환

토양에서 발아한 4-5일 된 유식물체의 정단분열 조직에 이쑤시개를 이용하여 상처를 내어 이미 발달된 분열 조직 세포들을 제거한 후, 그 상처부위에 50μM acetosyringone(Sigma)이 첨가 된 YEP 고체 배지(Bacto peptone 10g/l, yest extract 10/l, NaCl 5g/l, 1.5% bactoagar) *상에서 28℃, 암 조건의 배양기에서 이틀간 자란 Agrobacterium 균주 AGL1* (pCAMBIA3301-anti-GI)의 colonies를 접종하였다. 접종 후 암 처리하여 48시간동안 22℃에서 공동배양 하였다.

형질전환 여부를 확인하기 위하여 1차로 공동배양 후 식물체들을 온실에서 생육시킨 후 식물체의 잎 절편을 가지고 GUS 염색을 실시하여 일차적으로 형질전환체를 선발하였다. 이렇게 선발된 형질전환체는 저온처리 후 추대가 형성되면, 그 것의 꽃과 종자 도한 GUS 염색 분석을 수행하였다. 형질전환체의 종자는 silique 별로 구분하여 수확하였다. 2차로 형질전환체의 수확된 종자(T1 종자)들은 토양에 파종하여, 4~5일 된 유식물체가 되면 제초제인 basta에 대한 저항성 분석(0.03% basta 용액을 6일 간격으로 3회 처리함)을 통하여 후대의 형질전환체를 선발하였다. 선발된 후대의 형질전환체는 잎의 절편을 가지고 GUS 염색 분석을 하였으며, 잎으로부터 Genomic DNA를 분리하여 southern 분석을 하였다.

3) Floral dipping 방법에 의한 형질전환

토양에 파종한 뒤 건강하게 자란 식물체를 저온처리 하여 추대를 시켰다. 추대가 되어 꽃이 피게되면 이미 꽃이 열린 것을 제거하고, 아직 피지 않은 floral organ primodia를

YEP 배지에 키워 얻은 Agrobacterium cell pellet(pCAMBIA3301-anti-GI)을 녹인 B5 infiltration용액에 1분 동안 dipping 하였다. 또한 식물체의 줄기에 가윗날로 상처를 낸 후 infiltration 용액을 분무하는 것을 병행하여 처리하였다. 이렇게 처리된 식물체로부터 종자를 수확하였다.

형질전환체를 선발하기 위하여 수확된 종자를(T1 seeds) 토양에 파종하여 4-5일 후 유식물체가 되면 제초제인 basta에 대한 저항성 분석을 통하여 형질전환체를 선발하였다. 선발된 형질전환체는 잎의 절편을 가지고 GUS 염색 분석을 하였으며, 잎으로부터 Genomic DNA를 분리하여 southern 분석을 하였다.

4) GUS 염색

형질전환체의 선발과 분석을 위해서 gus 유전자의 발현이 분석되었다. 무의 잎가 꽃조직 그리고 종자를 GUS 반응용액(100mM sodium phosphate buffer(pH 7.0), 1mM EDTA(pH 8.0), 5mM potassium ferrocyanide, 5mM potassium ferricyanide, 1% Triton X-100, 0.001% X-gluc.)에 담 근 후 암 조건의 37℃ 배양기에서 10-12시간 반응 후, 80% EtOH에 담궈서 엽록소를 제거하였다.

5) Basta 저항성 분석

형질전환체의 선발을 위해서 *bar* 유전자의 발현을 분석하였다. 우선 형질전환체의 세심한 선발을 위해서 진주대평 무의 야생종이 죽는 basta의 가장 낮은 농도를 찾기 위해서 basta 원액을 0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.04%, 0.05%로 각각 희석한 용액을 야생종에 6일 간격으로 3 번씩 처리한 결과 0.03% 이상의 농도에서 야생종이 죽는 것을 확인하였다. 따라서 형질전환체의 선발을 위해서 0.03% basta 용액을 사용하였다. 토양에서 자란 4-5일 된 유식물체에 0.03% basta 용액을 6일 간격으로 3-5번 처리 한 후, 저항성을 보이는 식물체를 형질전환체로 선발하였다.

6) DNA gel blot analysis

형질전환체의 잎으로부터 Dellaporta(1983)의 방법으로 추출하였다. 추출한 genomic DNA를 *Hind* III로 절단 한 후 0.7% agarose gel에서 전기연동 하여 분리하였다. 분리

된 DNA가 있는 젤을 진공을 건 상태에서 0.25N HCl용액으로 20분 간, 변성용액(1.5M NaCl, 0.5N NaOH)으로 동일한 시간 각각 처리한 후, 이를 다시 중화용액 (0.5M Tris pH 7.0, 1.5M NaCl)으로 동일한 시간을 처리한 후 마지막으로 2X SSC (NaCl 17.53g/l, sodium citrate 8.2g/l, pH 7.0)로 10분 처리함으로서. neutral nylon membrane (S&S)으로 DNA를 옮기고 80℃에서 2시간 baking 하였다.

혼성화 반응은 DNA가 전이된 membrane을 혼성화 용액 (7% SDS, 1% BSA, 1mM EDTA, 0.5M sodium phosphate buffer pH 7.2)에 탐침 DNA를 함께 넣고 수행하였다. 탐침 DNA는 pCAMBIA3301 vector을 *Xho* I 으로 잘라서 얻은 0.5kb 크기의 *bar* gene 조각을 rediprime kit (Amersham)을 이용하여 ^{32}P 동위원소로 표지 하였다. 15시간 동안 혼성화 반응 후, 상온에서 세척용액 (0.1% SDS, 1X SSC)으로 두 번 반복해서 씻은 후 X-ray film에 3일에서 5일간 노출 후 현상하였다.

4. 조직배양 방법에 의한 형질전환 (위탁연구 참조 - 강원대학교)

5. 무 분자지도 작성 및 관련 분자표지 확인

1) 분자표지 지도 작성용 무 재료의 육성

고품질 가을무인 진주대평과 저 품질 봄 무인 시무의 교잡으로 잡종 제 1세대 종자를 수확하였다. 진주대평과 시무는 한농종묘에서 약 10대에 걸쳐서 고정한 고정종을 분양받아 이용하였다. 제 2세대 잡종 종자를 확보하기 위하여 제 1세대 잡종 을 자가수분시켜서 총 157종의 제 2세대 잡종 종자를 수확하였다. 확보한 제 2세대 잡종은 시험 포장에 전개하여 개화생리 빛 각종 품질의 형질을 조사하였으며, RFLP 분석을 위한 식물재료로서 이용하였다.

2) 분자표지 지도(RFLP Map) 작성을 위한 모본의 RFLP 조사

모 식물체의 RFLP pattern 정도를 조사하기 위해 무와 genome의 구조적 특성이 유사한 *Arabidopsis*에서 유래한 탐침을 이용하였다. 탐침의 확보는 ARMS marker, cosmid RFLP marker, Lambda marker, cDNA marker, genomic marker를 스탠포드 대학의 *Arabidopsis* stock center 및 Notingum stock center를 통하여 수행하였다. 모본에서의 RFLP 분석을 수행하기 위하여 한농종묘에서 분양 받은 시무와 진주대평으로부터 대량의 genomic DNA를 Dellaporta의 방법과 CsCl ultracentrifugation 방법을 병행하여 추출하였다. 분리된 모본의 genomic DNA를 *EcoR* I, *BamH* I, *Hind* III, *Dra* I, *Sac* I, *Xba* I 으로 완전히 절단한 다음 전기영동법으로 분리하여 다수의 genomic DNA blot을 확보하였다. 확보된 genomic blot과 marker를 대상으로 southern 방법을 통하여 잡종 2세대에서 segregation 결과 조사를 위해 다형성을 보이는 marker/enzyme 조합을 탐색하였다.

3) 잡종 2세대에서 RFLP pattern의 조사

RFLP 수행방법은 기존에 보고된 방법에 의해 실시하였다(Prince et al., 1993). 교배

모본간 polymorphism을 보이는 clone들은 분립집단 F2 93 개체를 대상으로 progeny test를 실시하여 각 개체들의 밴드 양상을 분석하였다.

분자 표지 사이의 연관을 분석하기 위해 MAPMAKER version 3.0을 이용하였고, 이때 최소 LOD값은 3.0, 최대 재조합율은 0.3을 지정하였다. 이후에 재조합율은 Cosambi 함수에 의해 centimorgan으로 전환하여 분석하였다.

4) 잡종 2세대의 개화생리 및 각종 품질 형질의 조사

분자표지 지도를 이용하여 품질 및 추대성 관련 형질의 유전자좌와 관련된 표현형마커를 탐색하기 위하여 phenotype marker가 될 수 있는 각종 형질분리도 및 추대성을 조사하였다. 시험포장에 전재된 시무와 진주대평의 잡종 2세대 157종에 대하여 각각 leaf color, trichome, leaf width, root color, petal color 및 bolting time을 조사하였다.

제 3 장 결 과 및 고 찰

1. Radish CONSTANS(RsCO) gene cloning 및 antisense expression vector 작제

1) RsCO의 RT-PCR cloning

*Aradidopsis*의 *co* 유전자에서 유래된 primer를 이용하여 무의 CONSTANS-homologue PCR product를 얻었다. 무의 게놈 RNA를 phenol-chloroform extraction 방법으로 정제한 루 ethanol 침전시켜 분리하였다. 분리된 무의 total RNA(0.5μg)로부터 1st cDNA를 합성하기 위해 3' 말단에 대응하는 primer와 Time Saver cDNA synthesis kit (Pharmacia Co.)을 사용 하였고 생성된 RNA-cDNA douplex로부터 CONSTANS-homologue 유전자를 증폭하기 위해 ExTaq(TaKARA Co.)와 5'말단 및 3'말단에 대응하는 primers를 첨가하여 PCR을 수행하였다. PCR은 DNA thermal cycler(Perkin-Elmer Co.)을 사용하여 denatureation (94℃, 1분), anealing(55℃, 1분), polymerization(72℃, 2분)의 cycle을 30회 반복하였고 최종 중합반응으로 10 반응시킨 결과 1.0kb PCR product를 얻었다.

무의 게놈 RNA를 대상으로 RT-PCR을 수행하여 얻어진 PCR product는 Promega Co. pGEM T-easy vector의 3'-T overhang에 연결하여 재조합 plasmid를 만들고 *Escherichia coli* TOP10을 숙주로 하여 형질전환을 유도하였다. 형질전환은 Cohen et al. 의 방법에 따라 competent cell을 만들어 사용하였다. PCR product가 삽입된 재조합 plasmid를 갖고 있는 형질전환체 선별은 β-galactosidase 활성을 이용한 α-complementation과 ampicillin 저항성을 이용하였다. 이렇게 얻어진 재조합 plasmid는 DNA 염기서열 결정을 위한 주형으로 사용하였다.

2) RsCO의 염기서열 결정 및 분석

DNA 염기서열 결정은 Sanger의 dideoxy chain termination 방법을 바탕으로

Parmacia Co. ALFTM express autocycle sequencing kit 제품과 pGEM T-easy vector의 M13 forward/Reverse sequencing primer binding site를 이용하여 양방향으로 염기서열을 결정하였다.

DNA 염기서열 분석은 염기서열 분석 프로그램인 DNASIS(Hitachi Software Engineering Co. Ltd)을 사용하여 정리하였고, 염기서열의 상동성 검색을 위해 미국의 NCBI에서 제공하는 Blastn과 Blastx를 이용하였다. 이외에도, Genebank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)와 EBI (http:// www.ebi.uk)에 구축된 염기서열 database를 상동성 검색에 이용하였다.

염기서열이 결정된 RsCO cDNA는 307개의 amino acid로 구성되어 있는 ORF가 발견되었으며(그림 1) AtCO의 염기서열과는 90% 이상의 상동성을 보였으며 62%의 amino acid sequence identity를 나타냈다. AtCO의 zinc finger conserved motif 부위와의 상동성 분석 결과 매우 높은 sequence identity를 보임으로서 RsCO 또한 zinc finger domain을 포함하고 있는 것으로 사료된다.(그림 2)

분리된 *RsCO 유전자의* 발현 양상을 분석하기 위하여 여러 발달 단계의 화아(bolting stage, 1 mm 이하, 3-5 mm, 10 mm 이상), 꽃받침, 꽃잎, 수술, 암술, 잎, 그리고 뿌리에서 분리한 전체 RNA를 대상으로 조사하였다. *RsCO*은 잎과 bolting stage의 화아에서 발현 정도가 높았고, 꽃잎, 암술 그리고 뿌리에서도 발현되었다 (그림 3). 염기서열 및 단백질의 분석 결과와 *RsCO*이 bolting stage에서 발현이 급격히 증가하는 점을 볼 때 R*sCO*는 AtCO와 마찬가지로 무의 추대 형성에 관여하는 zinc finger domain을 갖는 유전자 인 것으로 사료된다.

3) RsCO antisense 발현 벡터의 작제

분리한 RsCO 유전자를 만추대성 도입에 이용하기 위해서는 발현벡터를 개발하는 것이 필요하다. 이를 위하여 증폭된 DNA를 *EcoR* V로 절단한 후 CaMV35S promoter-NOS terminator를 가지고 있는 Shuttle Vector pCAMBIA 330(그림 4)1의 GUS 유전자 말단에 있는 *Pml* I site에 ligation한 후 CaCl2 방법으로 만들어진 *E.coli* TOP 10 competent cell에 heat shock (42℃ 1분) 처리하여 형질전화 시켰다. 형질전환체는 ampicillin (50㎍/㎖)을 포함하는 LB plate에서 16시간 배양하여 선별하였다. 형질

전환된 colony로부터 plasmid를 분리하여, *Pst* I 으로 절단 후 agarose gel 전기영동으로 RsCO 유전자가 antisense 방향으로 삽입하였다(그림 5). 확인된 plasmid를 식물의 형질전환에 이용하기 위하여 electroporation 방법으로 *Agrobacterium tumefacience* AGL1에 도입되었다. 도입된 RsCO 유전자는 pCAMBIA3301 벡터의 intron-GUS 유전자와 fusion된 상태로 발현되었다.

2. *gi* gene cloning 및 antisense expression vector 작제

1) *gi* map-based cloning

gi gene의 cloning은 map-based cloning 방법을 통하여 수행하였다. *gi* locus와 F2 progeny 1000개 이상에서도 recombination이 일어나지 않는 가까운 genetic marker인 *th*1 gene을 포함하는 *Arabidopsis* YAC library, BAC library, cosmid library clone을 Stanford 대학에 위치한 Arabidopsis stock center에서 분양 받았다. *th*1 유전자가 위치한 것으로 알려진 F19G10 BAC clone을 중심으로 T26J12, T22J18,의 contig를 작성한 후(그림 6) 이후의 RFLP 분석을 통한 유전자 cloning에 이용하였다.

X-ray에 의해 유도된 deletion mutant인 *gi*-1 및 *gi*-2 와 야생형 *Arabidopsis*인 Columbia로부터 total genomic DNA를 Dellaporta(1983)의 방법으로 추출하였다. F19G10, T26j12, T22J18의 세 종의 BAC contig와 추출한 세 종의 genomic DNA를 다양한 조합의 제한 효소로 절단 한 후 0.7% agarose gel에서 전기영동하여 분리한 후 membrane에 옮기고 혼성화 반응을 실시하였다.

혼성화 반응은 DNA가 전이된 membrane을 혼성화 용액 (7% SDS, 1% BSA, 1mM EDTA, 0.5M sodium phosphate buffer pH 7.2)에 탐침 DNA를 함께 넣고 수행하였다. 탐침 DNA는 *BamH* I 으로 절단된 3종의 BAC DNA를 rediprime kit (Amersham)을 이용하여 ^{32}P 동위원소로 표지 하였다. 15시간 동안 혼성화 반응 후, 상온에서 세척용액 (0.1% SDS, 1X SSC)으로 두 번 반복해서 씻은 후 X-ray film에 3일에서 5일간 노출 후 현상하였다.

GI 유전자를 포함할 것으로 예상되는 세 개의 BAC clone을 이용한 RFLP결과 그림 7

과그림 8과 같이 gi-1에서 Stu I절단시 약 8 Kb 의 새로운 band 가 나타났다. 7Kb 와 1 Kb의 해당 조각을 pZeRO 2 vector 내로 subcloning 하여 염기서열을 결정한 결과 현지까지 알려지지 않은 전혀 새로운 약 5 Kb의 비교적 큰 유전자로 최종 판명되었다. 이 유전자가 g*i* mutation phenotype을 유발하는 GI 유전자 인지의 여부를 판별하기 위하여 23L3 BAC clone을 20kb 정도의 sublibrary로 만들어 *gi* 변이체의 complementation 실험을 실시한 결과 GI 유전자임을 확인하였다.(Science 지 발표) 또한 이에 해당하는 유전자를 gi-1 과 gi-2에서 PCR로 cloning 하여 염기서열을 결정한 결과, GI 유전자는 3504bp, 1168개의 amino acid로 구성되었으며 13개의 exon 12개의 intron으로 구성되었다. gi-1 유전자의 경우 996 번째 amino acid 부위에 5bp가 deletion 됨으로서 nonsense mutation이 발생하였고, *gi*-2의 경우는 158번 째 amino acid 부위에서 7bp가 deletion 됨으로서 frame shift mutation이 발생하여 GI 유전자의 기능을 상실하였음을 밝혔다(그림 9). 또한 이 유전자는 Southern에 의해 한 종류만이 존재하며(그림 10) Northern에 의하여 *gi*-1 과 *gi*-2에서 transcript의 양이 줄어 듬을 확인하여 최종 이 유전자가 *Arabidopsis*의 개화관련 유전자인 GI 임을 확인하였다(그림 11). 그러나 Northern에서는 transcript의 크기가 예상보다 큰 4.5 Kb 정도에서 강하게 나타났으며 약 3 Kb 정도에서도 약하게 한 개가 더 나타나 이 유전자는 alternative splicing 혹은 불완전한 RNA 합성 과정 때문일 것으로 추정된다.

2) *GI* 유전자의 기능 연구

Arabidopsis의 게놈 RNA를 대상으로 RT-PCR을 통하여 3504 bp의 완전한 길이의 Arabidopsis의 *GI* cDNA를 분리해 냈으며 이 유전자는 기존 유전자은행의 검색에서 완전히 새로운 유전자로서 밝혀졌다. 이 유전자의 기능을 살펴보기 위해 일단 생체시계에 관련성을 살펴보기로 하였다. 생체 시계 시스템은 이미 일장관련 개화와 관련이 있을 것으로 오랫동안 제시돼 왔다. 생체 시계 시스템을 검증하는 방법들은 몇 가지 경우에 일반화된 연구 방식이 사용되고 있으며 그 중 생체시계 현상과 가장 잘 알려진 잎의 수직운동을 비디오 시스템을 사용하여 촬영 분석한 결과 *gi-1*, 및 *gi-2* 돌연변이체에서 모두 주기가 빨라짐을 알 수 있었다 (그림 12, A, B). 또한 식물 유전자 중 그 발현이 생체시계 현상으로 가장 많이 연구된 CAB 유전자의 프로모터에 Luciferase를 연

결한 리포터 시스템을 사용하여 두 돌연변이체에서 발현 패턴을 분석한 결과 *gi-1*에서는 주기가 빨라짐을 반대로 *gi-2*에서는 주기가 느려짐을 관찰 할 수 있었다 (그림 12 B 와 표 1).

이러한 사실로서 이 유전자는 어떠한 방식으로든 생체시계와 관련이 있으며 이 관련성에 의해 이 유전자의 고장이 장일 조건에서의 개화 지연 현상을 야기하는 것으로 보고 이 유전자가 어떤 형식으로 생체시계 시스템과 관련됐는지를 살펴보기로 했다. 우선 유전자 수준에서 생체시계 현상을 관찰하기 위하여 12시간 명/ 12시간 암상태 23도에서 키운 식물체를 23도에서 계속 광 상태로 옮겨 키운다. 이때 내부적인 생체 시계의 리듬에 따라 관련 유전자들은 몇 일 동안 계속 발현에 있어 명/암처리 시와 같은 발현 양상을 보이게 된다. 물론 암 상태로 유지되더라도 같은 현상이 일어난다. 이러한 실험을 수행한 결과 본 유전자는 명상태에서 내부적으로 가동되는 생체시계의 정확성을 위해서 필수적인 인자로서 작용하고 있음을 알게 되었다 (그림 14의 A). 암 상태로 이전되었을 시는 명 상태와는 달리 큰 차이가 보이지 않아 아마도 이 유전자는 생체시계 관련 광을 인지하는 시스템과 밀접한 관련이 있을 것으로 여겨진다 (그림 14의 B).

생체시계의 광 인식 기작에는 기존에 Phytochrome이 관련성이 알려져 있었기 때문에 붉은 색광만을 단용하여 이 유전자의 반응성을 관찰한 결과 붉은색 광 인식에 있어 문제가 있음을 알게 되어 이 유전자의 역할이 광에 의한 일장인식과 관련된 정보를 생체시계로 전달해주는 역할을 수행하고 있음을 알게 되었다 (그림 15).

표 1. gi mutant 에서의 Leaf movement의 circadian periods 와 *cab2::luc* expression

Genotype	Mean period length (hours)	
	Leaf movement (*n*)	*cab2::luc* (*n*)
Wild type	(Col) 25.2 ± 0.2 (18)	(*gi-1* F_2) 23.4 ± 0.4 (21)
gi-1/gi-1	(Col) 22.4 ± 0.3 (4)	(*gi-1* F_2) 21.8 ± 0.4 (21)
GI/gi-1	ND	(*gi-1* F_2) 22.9 ± 0.6 (27)
Wild type	(Col) 25.2 ± 0.2 (18)	(*gi-2* F_2) 24.0 ± 0.6 (8)
gi-2/gi-2	(Col) 21.1 ± 0.7 (7)	(*gi-2* F_2) 26.2 ± 0.5 (10)
GI/gi-2	ND	(*gi-2* F_2) 23.9 ± 0.4 (18)

3) *GI* antisense 발현 벡터의 작제 및 *Arabidopsis*에의 도입

분리 분석이 완료된 *GI* 유전자의 응용적 측면에서의 기능을 알아보기 위하여 GI 유전자와 cDNA를 sense 와 antisense 형으로 발현하도록 벡터를 제작하였다. (그림 16, 17)

일반적인 방법에 따라 우선적으로 *Arabidopsis*의 *gi* 돌연변이체와 야생형에 도입하여 형질전환체를 적정 수 이상 확보하였다. 우선적으로 돌연변이체내로 도입된 sense 발현체를 분석한 결과 도입된 *GI* 유전자에 의해서 돌연변이 표현형이 완전히 복구됨을 관찰하였다. 또한 야생형에 도입된 경우에도 몇몇 개체에서 약 30 % (잎 수 기준)까지 개화시기가 앞 당겨짐을 관찰 할 수 있었다(그림 18).

3. 비 조직배양 방법에 의한 형질전환

1) Floral dipping 방법에 의한 형질전환

진주대평무 종자를 파종한 후, 추대가 되어 꽃이 핀 상태의 개체를 대상으로 Floral dipping 방법에 의한 형질전환을 시도하였다. 이미 핀 꽃들은 제거하고 floral primodia 상태의 것들을 *Agrobacterium* 용액에 dipping 하였다. 식물은 추대 형성의 시기중 어느 때가 형질전환에 가장 적절한 시기인지를 판별하기 위하여 primary bolt(inflorescence height가 3-9cm), secondary bolt(10-15cm), 및 tertiary bolt(16-24)의 3단계로 나누어 dipping stage를 결정하였다. 또한 floral dipping에 의한 형질전환의 필수적인 요소로 알려진 정착제 silwet L-77, Pluronic F-68, Tween 20을 0, 0.01, 0.05, 0.1%로 첨가하여 형질전환 효율을 판별하였다. 그림 19는 Floral dipping에 의한 형질전환을 모식적으로 나타낸 그림이다.

형질전환 1세대 식물의 선발을 위해서 basta 야생형 무가 necrosis를 일으키는 최적의 농도를 결정하였다(그림 20). 0.03%의 basta 용액에서 모든 야생형 무가 necrosis를 일으키는 최저 농도로 판별되었으며, 형질전환체를 선발하기 위하여 온실에서 재배한 형질전환 1세대 식물에 일주일 간격으로 3회 0.03% basta 용액을 처리한 후 necrotic dwarf plant 집단에서 형질전환 1세대 식물을 선발하였다(그림 21A). necrotic leaves를

갖는 식물은 GUS 분것에 의해 특이적 color를 띄지 못하였으나(그림 21B), basta에 저항성을 보이는 식물은 GUS 특유의 blue color를 발색하였다(그림 21C). 그림 21의 D, E, F, G, H는 야생형 무와 형질전환 무의 기관별 GUS 분석 결과로서, 야생형의 경우 전혀 blue clolr를 띄지 못하나 형질전환체의 경우 모든 조직에서 blue color를 띔으로 GUS 발색반응은 형질전환 식물에 국한됨을 보이고 있다. 또한 Southern blot 분석결과(그림 22A, B, C) GUS 발색반응 및 basta에 저항성을 보이는 식물의 경우 1 또는 2 개의 T-DNA가 삽입되어 있음을 보이고 있다.

형질전환 조건에 계면활성제가 미치는 조건을 분석하기 위한 각각의 정착제의 농도별 형질전환 조건 및 결과는 표 2에 정리하였다.

이 결과에 의하면 primary bolting stage에 0.05%의 Silwet L-77의 조건에서 최적의 형질전환 효율을 보였으며, tertiary bolting stage에 floral dipping한 식물의 경우는 모든 농도의 정착제에 대하여 0%의 형질 전환 효율을 보였다. 또한 0.1% Pluronic-F68 및 primary bolting stage에서도 0.3%의 형질전환 효율을 나타내어 Silwet L-77이외의 다른 정착제도 floral dipping에 의한 형질전환에 이용될 수 있음을 보였다

표 2. 각각의 추대 조건 및 정착제의 농도에 따른 형질전환 효율

Surfactant	*Stage of developing bolt*		
	Primary	*Secondary*	*Tertiary*
0.01% Silwet L-77	1/990 = 0.1%	0/1086 = 0%	0/722 = 0%
0.05% Silwet L-77	15/1110 = 1.4%	2/1145 = 0.2%	0/686 = 0%
0.1% Silwet L-77	1/851 = 0.1%	1/718 = 0.1%	0/502 = 0%
0.01% Pluronic-F68	0/1222 = 0%	0/1040 = 0%	0/644 = 0%
0.05% Pluronic-F68	0/1097 = 0%	0/946 = 0%	0/409 = 0%
0.1% Pluronic-F68	3/966 = 0.3%	1/867 = 0.1%	0/480 = 0%
0.01% Tween-20	0/1123 = 0%	0/807 = 0%	0/568 = 0%
0.05% Tween-20	0/749 = 0%	1/691 = 0.1%	0/405 = 0%
0.1% Tween-20	0/766 = 0%	0/620 = 0%	0/390 = 0%
No surfactant	0/1125 = 0%	0/1070 = 0%	0/774 = 0%

.

표 3. 형질전환 종자의 bolting stage에 따른 출처

Plant code	*Treatment*	Condition of bolt when dipped	Site of silique containing transformed seed
Si1	0.01% Silwet L-77	primary	first secondary bolt
Si2	0.05% Silwet L-77	primary	first secondary bolt
Si3	0.05% Silwet L-77	primary	primary bolt
Si4	0.05% Silwet L-77	primary	primary bolt
Si5	0.05% Silwet L-77	primary	primary bolt
Si6	0.05% Silwet L-77	primary	primary bolt
Si7	0.05% Silwet L-77	primary	primary bolt
*Si8	0.05% Silwet L-77	primary	primary bolt
*Si9	0.05% Silwet L-77	primary	primary bolt
Si10	0.05% Silwet L-77	primary	first secondary bolt
Si11	0.05% Silwet L-77	primary	first secondary bolt
Si12	0.05% Silwet L-77	primary	first secondary bolt
Si13	0.05% Silwet L-77	primary	first secondary bolt
Si14	0.05% Silwet L-77	primary	first secondary bolt
Si15	0.05% Silwet L-77	primary	primary bolt
Si16	0.05% Silwet L-77	secondary	first secondary bolt
Si17	0.05% Silwet L-77	secondary	first secondary bolt
Si18	0.05% Silwet L-77	primary	primary bolt
Si19	0.1% Silwet L-77	primary	primary bolt
Si20	0.1% Silwet L-77	secondary	first secondary bolt
Pl1	0.1% Pluronic-F68	primary	second secondary bolt
Pl2	0.1% Pluronic-F68	primary	primary bolt
Pl3	0.1% Pluronic-F68	primary	primary bolt
Pl4	0.1% Pluronic-F68	secondary	first secondary bolt
Tw1	0.05% Tween-20	secondary	third secondary bolt

*Originated from same silique.

표 3에는 floral dipping에 의한 형질전환 시 최적의 stage를 결정하기 위하여 얻어진 형질전환체를 bolting stage에 따라 정리한 것이다. 이대부분의 형질전환체는 primary bolting stage나 first secondary bolting stage에서 발생한 silique에서 유래한 것으로 분석되어졌다. 따라서 floral dipping에 의한 형질전환은 가능한 초기의 bolting stage에 실시하는 것이 형질전환 효율제고에 유리하다고 사료된다.

형질전환 2세대에 대하여 GUS 발색반응을 통하여 segregation 분석한 결과(표 4) 상당수의 형질전환 식물이 멘델의 법칙에 가까운 segregation pattern을 보임을 확인 하였다. 그러나 *Arabidopsis*의 형질전환의 경우와 유사하게 상당수의 형질전환 식물이 멘델의 법칙에 의한 segregation pattern을 보이지 않았다.

표 4. 형질전환 2세대 식물의 segregation pattern 분석

Plant code	Number of plants GUS positives (+)	GUS negatives (-)	Expected ratio +/-	High GUS expressors Number of plants	%
Si3	30	10	3:1*	28	93
Si4	32	10	3:1*	32	100
Si10	18	5	3:1*	8	44
Si11	24	7	3:1*	24	100
Si17	36	12	3:1*	34	94
Pl1	22	6	3:1*	20	91
Tw1	32	11	3:1*	28	88

*P > 0.85

2) 정단분열 조직의 상처부위에 *Agrobacterium*의 *in planta* 접종에 의한 형질전환

인공 토양에 진주대평무 종자를 파종하여 4-5일 된 유식물체를 대상으로 이 방법을 적용하였다. 유식물체는 떡잎 만을 가지고 있는 상태이며, 양쪽으로 떡잎을 가르고 정단분열조직이 있는 부위에 이쑤시게, caborendom 등을b사용하여 상처를 내었다. 그리고 나서 그 상처부위에 Agrobacterium colonies를 접종하였다. 접종에 사용된 Agrobacterium을 키우는 배지에는 50μM acetosyringone을 첨가하여 배양하였다. 접종 후에는 암 처리를 한 후, 22℃에서 48시간 동안 공동배양하였다.(그림 23)

상처에 의해 이미 발달되어 있던 정단분열 조직 세포들이 제거 되었을 것으로 여겨진다. 그러나 그 세포들은 전부가 제거되었을 수도 있고, 전부가 제거되었을 수도 있다. 유식물체는 상처에 의해 제거된 분열조직 세포의 역할을 대신하기 위해 부정 분열조직 세포들이 발달될 것이다. 유식물체로부터의 shoot의 발생은 남아있는 정잔 분열조직세포나 부전분열조직 세포의 발달에 의한 것이다. T-DNA는 이 세포들의 염색체로 도입될 것이다. 이러한 과정 중에서 상처나 Agrobacterium의 감염에 의해 극복할 수 없는 손상을 입은 유식물체는 어쩐한 shoot도 발생하지 못하고 죽게된다. 그러나 그러한 손상을 극복한 유식물체는 shoot를 발생하여 자라나게 된다. 표2에서 보는 바와 같이 초기에 접종 된 1.504개체로부터 737 개체만이 shoot를 발생하여, 50% 정도다 살아남는 것으로 나타났다. 이중 GUS 가 발현되는 3종의 transgenic line을 얻었다. 이중 A0-13-6 transgenic line.의 경우, 1개의 추대가 발생하였으며, 그 추대에서 얻어진 잎, 꽃, 종자에서 모두 gus 유전자의 강한 발현을 보였다(그림 24). gus 유전자가 발현된 형질전환체로부터 형질전환 1세대 종자를 수확하여 분석한 결과 약 67%의 progeny에서 형질전환 frequency를 나타내었으며 basta 저항성 또한 나타내었다(그림 25). gus 분석과 basta 분석을 통하여 형질전환 1세대에 도입한 유전자가 안정적으로 이전됨을 확인하였으나, genomic southern blot analysis를 통하여 염색체 내에

표 5. *In planta* 접종방법에 의해 수행된 배치별 결과

	초기 접종된 개체수	Shoot를 발생한 개체수	선별된 형질전환체의 개체수
1번 batch	125	84	1(A0-13-6)
2번 batch	78	31	0
3번 batch	317	183	1(A1-18-12)
4번 batch	106	58	0
5번 batch	106	52	0
6번 batch	108	19	0
7번 batch	108	68	0
8번 batch	108	40	0
9번 batch	304	70	0
10번 batch	144	132	1(A8-6-11)
합계	1504	737	

T-DNA의 삽입을 확인하고자 하였다. 그 결과 gus 유전자가 발현되는 형질전환 1세대에서 T_DNA가 형질전환체의 염색체 내로 도입되었음이 분자생물학적 수준에서 확인되었다(그림 26) 분석된 형질전환체는 모두 1개의 T-DNA가 도입되었으며, 6kb와 4.3kb의 두 가지 크기의 band가 나타났다. 탐침으로 사용된 bar 유전자(약 500bp)에 의해 약 2kb 크기의 T-DNA가 검출되므로, 나머지 4kb와 2,4kb는 flanking된 식물체의 DNA로 사료된다.

이 연구를 통하여 in planta transformation을 통하여 무의 형질전환이 가능하며, 도입된 유전자 또한 안정적으로 후대에 도입됨을 증명하였다.

3 Anti-gignatea(GI) 형질전환체의 유용성 평가

Floral dipping 및 in planta 형질전환법에 의해 형질전환 무를 제조한 후 형질전환된 anti-GI 유전자가 개화시기 지연효과를 보이는지 여부를 판별하였다. GI 유전자를 강하

게 발현되는 constitutive promoter인 CaMV 35S와 nos terminator에 결합시킨 expression cassette를 형질전환시킨 *arabidopsis*의 경우 야생형에 비하여 GI 유전자의 over-expression에 의해 개화시기가 당겨짐을 본 연구과정에 보였다(그림 18). 이는 바꾸어 말하면 endogenous GI의 발현 정도를 인위적으로 낮춘다면 개화 지연효과를 나타낼 것으로 사료하였다. endogenous GI의 발현 정도를 낮추기 위해서는 pCAMBIA-anti-GI를 이용하여 antisense suppression 방법을 이용하였다.

개화 시기의 분석은 우선적으로 floral dipping 방법에 의해 형질전환 1세대 16 개체를 대상으로 야생형과 개화시기를 비교하였다(표 6). 분석된 16종의 anti-GI 형질전환 식물 중 8 개체는 야생형에 비하여 먼저 추대 형성 및 개화하였고, 8종은 야생형 보다 늦게 추대 형성 및 개화하였다.

야생형에 비하여 추대형성 시기가 앞 당겨진 7종의 형질전환체(J, L, H, D, O, C, W)와 pCAMBIA3301만을 도입한 형질전환 2세대를 대상으로 early flowering 특성이 유지되는지를 분석하기 위하여 개화시기 분석을 실시하였다. 그 결과 파종 53일 후 58%의 야생형 무와 75%의 pCAMBIA3301을 도입한 형질전환 2세대 식물이 추대를 형성 한 반면, anti-GI를 도입한 형질전환 2세대 7종은 여전이 영양성장 단계에 머물러있었다(data not shown). 이러한 결과는 anti-GI 형질전환 1세대에서 중 7종의 식물에서 보인 early flowering 형질이 후대에 유전되지 않음을 보인 것이다. 또한 형질전환 1세대에서 late flowering 형질을 보인 5종의 형질전환체 2세대(U, P, 12-2-E, S, R) 각 64 개체에 대하여 개화시기 분석을 한 결과 야생형이 51±10 일에 초대를 형성한 것에 비하여 각각 119, 124, 158, 124, 130 일에 추대를 형성하여 무에서 anti-GI 유전자의 발현이 개화시기 지연효과를 나타냄을 보였다.

표 6. Anti-GI 형질전환체의 개화시기 분석결과

Plant code	Time to bolting (d)	Time to anthesis (d)	Plant height (cm)
J	36	64	54
L	40	58	45
H	36	65	63
4-2-E	59	64	170
E	36	63	65
D	36	46	70
O	29	32	56
C	33	37	58
V	28	32	35
W	54	63	75
Q	80	89	57
*U	119	128	91
*P	124	134	64
*12-2-E	158	164	nd
*S	124	138	54
*R	130	142	64
aWildtype	51 ± 10	58 ± 10	129 ± 36

* Failed to bolt 88days after sowing. These plants were vernalised for 10 days,
a Mean±S.D> of a population of 64 plants

위의 clone들로 200여 개의 genomic marker와 cDNA marker를 선발하였다. 이중 약 50여 개의 marker를 이용하여 모본으로부터 polymorphism을 보이는 enzyme/marker조합을 탐색한 결과 60%이상의 clone에서 한 개 이상의 polymorphic band가 나타남을 확인하였다. 또한 F2 segregation population에서 segregation pattern을 분석하기 위한 조건을 확립하기 위하여 92종의 F2 genomic DNA를 제한효소로 절단, DNA blot을 제작하였다. 현재 30종 이상의 cDNA marker로부터 segregation data를 확보하였으며 얻어진 결과를 MapMaker/XL을 통하여 분석하였다 (그림 27, 표 7).

4) 잡종 2세대의 개화생리 및 각종 품질 형질의 조사

본 연구에서 작성될 예정인 분자표지 지도를 이용하여 추후, 품질 및 추대성관련 형질의 유전자좌와 관련, QTL 분석이나 특정 형질에 관련된 유전자의 분석을 용이하게 하는데 있어서 phenotype marker가 될 수 있는 각종 형질분리도 및 추대성을 조사하기 위하여 동원농산종묘의 용인 시험포장에 전개된 시무와 진주대평의 잡종 2세대 173종에 대하여 각각 leaf color, trichome. leaf width, root color, petal color및 bolting time을 조사하였다.

조사된 결과는 그림 28과 같으며, 결과에 대한 분석은 표 8에 요약되어 있다. leaf width와 root color의 경우 wide와 green color가 각각 우성적으로 3:1의 분리비를 보이며, petal color의 경우 purple color와 white color가 codominant 양상을 보이고 있다. 실제로 이러한 형질이 직, 간접적으로 추대 및 품질관련형질들의 선발표지로 이용될 수 있을 것으로 생각되나, 아직까지 이에 대한 보고는 없다. 따라서 잡종 2세대의 표현형 분리비와 추대관련 형질의 관계는 잡종 3세대 및 그 후대의 분리관계를 조사하여야 비교적 정확한 판단이 가능하리라 생각한다. 그 외에 추대형성 시기에 관련된 조사결과는 추대형성 시기에 관련된 개체의 집단이 처음 추대 형성개체의 출현이후 19일을 중심으로 5:1 비율로 두 집단으로 나누어지는 양상을 보이나, 정확한 결과는 잡종 3세대 및 후대에서 RFLP map과 함께 비교 분석해야 알 수 있을 것으로 생각된다.

4. 조직배양 방법에 의한 형질전환 (위탁연구 참조 - 강원대학교)

5. 무 분자지도 작성 및 관련 분자표지 확인

1) 분자표지 지도 작성용 무 재료의 육성

고품질 가을무인 진주대평과 저 품질 봄 무인 시무의 교잡으로 잡종 제 1세대 종자를 수확하였다. 진주대평과 시무는 한농종묘에서 약 10대에 걸쳐서 고정한 고정종을 분양받아 이용하였다. 제 2세대 잡종 종자를 확보하기 위하여 제 1세대 잡종 을 자가수분시켜서 총 157종의 제 2세대 잡종 종자를 수확하였다. 확보한 제 2세대 잡종은 시험 포장에 전개하여 개화생리 및 각종 품질의 형질을 조사하였으며, RFLP 분석을 위한 식물재료로서 이용하였다.

2) 분자표지 지도(RFLP Map) 작성을 위한 모본의 RFLP 조사

모 식물체의 RFLP pattern 정도를 조사하기 위해 무와 genome의 구조적 특성이 유사한 *Arabidopsis*에서 유래한 탐침을 이용하였다. 탐침의 확보는 ARMS marker, cosmid RFLP marker, Lambda marker, cDNA marker, genomic marker를 스탠포드 대학의 *Arabidopsis* stock center 및 Notingum stock center를 통하여 수행하였다. 모본에서의 RFLP 분석을 수행하기 위하여 한농종묘에서 분양 받은 시무와 진주대평으로부터 대량의 genomic DNA를 Dellaporta의 방법과 CsCl ultracentrifugation 방법을 병행하여 추출하였다. 분리된 모본의 genomic DNA를 *EcoR* I, *BamH* I, *Hind* III, *Dra* I, *Sac* I, *Xba* I 으로 완전히 절단한 다음 전기영동법으로 분리하여 다수의 genomic DNA blot을 확보하였다. 확보된 genomic blot과 marker를 대상으로 southern 방법을 통하여 잡종 2세대에서 segregation 결과 조사를 위해 다형성을 보이는 marker/enzyme 조합을 탐색하였다.

3) 잡종 2세대에서 RFLP pattern의 조사

Radish의 Comparative map 작성을 위한 marker는 같은 십자화과인 *Arabidopsis*의 genome 상에 고르게 분포되어 있는 marker와 추대성에 관련된 것으로 알려진 loci 주

위의 clone들로 200여 개의 genomic marker와 cDNA marker를 선발하였다. 이중 약 50여 개의 marker를 이용하여 모본으로부터 polymorphism을 보이는 enzyme/marker조합을 탐색한 결과 60%이상의 clone에서 한 개 이상의 polymorphic band가 나타남을 확인하였다. 또한 F2 segregation population에서 segregation pattern을 분석하기 위한 조건을 확립하기 위하여 92종의 F2 genomic DNA를 제한효소로 절단, DNA blot을 제작하였다. 현재 30종 이상의 cDNA marker로부터 segregation data를 확보하였으며 얻어진 결과를 MapMaker/XL을 통하여 분석하였다 (그림 27, 표 7).

표 7. 잡종 2세대의 segregation 분석결과

H	M	P	U	Expected Value			Chi-square
				H	P	P	value(1:2:1)
42	14	33	2	44.5	22.25	22.25	8.512
47	15	29	0	45.5	22.75	22.75	5.399
46	14	30	1	45	22.5	22.5	7.057
52	12	26	1	45	22.5	22.5	10.601
42	19	26	4	43.5	21.75	21.75	1.146
53	16	22	0	45.5	22.75	22.75	3.935
46	18	23	4	43.5	21.75	21.75	0.985
46	15	30	0	45.5	22.75	22.75	5.762
46	9	34	2	44.5	22.25	22.25	23.617
45	12	34	0	45.5	22.75	22.75	13.358
38	22	29	2	44.5	22.25	22.25	2.686
45	18	26	2	44.5	22.25	22.25	1.550
42	16	33	0	45.5	22.75	22.75	6.323
45	25	21	0	45.5	22.75	22.75	0.354
63	16	12	0	45.5	22.75	22.75	17.339
46	12	29	4	43.5	21.75	21.75	9.870
43	25	19	4	43.5	21.75	21.75	0.826
41	24	20	5	43	21.5	21.5	0.470
47	22	22	0	45.5	22.75	22.75	0.099
52	27	8	4	43.5	21.75	21.75	26.043
56	14	21	0	45.5	22.75	22.75	7.583
47	16	28	0	45.5	22.75	22.75	3.880
46	24	18	3	44	22	22	1.143
41	31	17	2	44.5	22.25	22.25	4.390
51	9	27	1	45	22.5	22.5	21.706
54	11	26	0	45.5	22.75	22.75	14.295
54	11	25	1	45	22.5	22.5	13.773
49	20	17	5	43	21.5	21.5	2.038
51	20	15	5	43	21.5	21.5	4.184
41	26	22	2	44.5	22.25	22.25	0.842

These clones are single locus in *A.thaliana,* but multiple loci in *R.sativus.* **Phenotype abbreviations=** - = unknown, M = maternal, P = paternal, H = heterozygote C = maternal like, D = paternal like

4) 잡종 2세대의 개화생리 및 각종 품질 형질의 조사

본 연구에서 작성될 예정인 분자표지 지도를 이용하여 추후, 품질 및 추대성관련 형질의 유전자좌와 관련, QTL 분석이나 특정 형질에 관련된 유전자의 분석을 용이하게 하는데 있어서 phenotype marker가 될 수 있는 각종 형질분리도 및 추대성을 조사하기

위하여 동원농산종묘의 용인 시험포장에 전개된 시무와 진주대평의 잡종 2세대 173종에 대하여 각각 leaf color, trichome. leaf width, root color, petal color및 bolting time을 조사하였다.

조사된 결과는 그림 28과 같으며, 결과에 대한 분석은 표 8에 요약되어 있다. leaf width와 root color의 경우 wide와 green color가 각각 우성적으로 3:1의 분리비를 보이며, petal color의 경우 purple color와 white color가 codominant 양상을 보이고 있다. 실제로 이러한 형질이 직, 간접적으로 추대 및 품질관련형질들의 선발표지로 이용될 수 있을 것으로 생각되나, 아직까지 이에 대한 보고는 없다. 따라서 잡종 2세대의 표현형 분리비와 추대관련 형질의 관계는 잡종 3세대 및 그 후대의 분리관계를 조사하여야 비교적 정확한 판단이 가능하리라 생각한다. 그 외에 추대형성 시기에 관련된 조사결과는 추대형성 시기에 관련된 개체의 집단이 처음 추대 형성개체의 출현이후 19일을 중심으로 5:1 비율로 두 집단으로 나누어지는 양상을 보이나, 정확한 결과는 잡종 3세대 및 후대에서 RFLP map과 함께 비교 분석해야 알 수 있을 것으로 생각된다.

표 8. 각종형질의 유전적 분석 결과

조사결과 / 조사형질	표현형	개체수/조사수	분리비	Dominance	$\chi 2$	P value	모계형질	
							진주대평	시무
Root color	Green	119/172	3	dominant	3.10	0.05<P<0.08	Green	White
	White	53/172	1	recessive				
Leaf color	wide	131/166	3	dominant	1.36	0.20<P<0.30	Wide	Narrow
	Narrow	35/166	1	recessive				
petal color	Purple	47/164	1	codominant	4.83	0.08<P<0.20	Purple	White
	Mordera te	68/164	2	semidomina nt				
	White	49/164	1	codominant				

```
1     A AAC AAT AAA GAT TTA GAG AGA GAA AGG GAG AAG AAA CAT CAA TCA      46

47  ATG GCG TCG AGA CTG TGC GAC TCG TGC AGA TCC GCG GCC GCG ACT CTG      94
1   M   A   S   R   L   C   D   S   C   R   S   A   A   A   T   L      16

95  TAC TGC CGC GCG GAC GCT GCG TTT CTC TGC GGC GAG TGC GAC GGA AAA     142
17  Y   C   R   A   D   A   A   F   L   C   G   E   C   D   G   K      32

143 ATC CAC ACG GCT AAC AAA CTC GCC TCG CGC CAC GAG CGA GTC TTG CTC     190
33  I   H   T   A   N   K   L   A   S   R   H   E   R   V   L   L      48

191 TGC CAA ATC TGC GAA CAA GCC CCC GCT CAC GTC ACG TGC GAA GCC GAC     238
49  C   Q   I   C   E   Q   A   P   A   H   V   T   C   E   A   D      64

239 GCA GCA GCG CTC TGC GTC ACG TGC GAC AGA GAC ATC CAC TCC GCC AAT     286
65  A   A   A   L   C   V   T   C   D   R   D   I   H   S   A   N      80

287 CCA CTC TCC CGC CGC CAC GAA CGC GTC TCC GTC ACG CCT TTC TAC GAC     334
81  P   L   S   R   R   H   E   R   V   S   V   T   P   F   Y   D      96

335 GCT CCT GCT CAG GGA GGA TCA CCG GCC ACC ACC AAA TCC GCC GCC TCC     382
97  A   P   A   Q   G   G   S   P   A   T   T   K   S   A   A   S     112

383 TCC AAT TTA TTT GGC GAA GAT GCT GAC GTG AGC ATG GAG GCT GTG TCT     430
113 S   N   L   F   G   E   D   A   D   V   S   M   E   A   V   S     128

431 TGG CTC TTG CCT AAC CCG AGT GTC AAG GAA GGA GTC GTT GTG GAG ATC     478
129 W   L   L   P   N   P   S   V   K   E   G   V   V   V   E   I     144

479 CCT AAC TTG TTT GCC GAT CTT GAT TAC TCG GCG GTT GAT CCG AAG ATG     526
145 P   N   L   F   A   D   L   D   Y   S   A   V   D   P   K   M     160

527 GAG GCG TCG GAG AAT AGC TCC GGG AAC GAC GGA GTC GTT CCT GTT CAG     574
161 E   A   S   E   N   S   S   G   N   D   G   V   V   P   V   Q     176

575 ACA AAA GCT CTG TTT CTC AAC GAA GAT TAC TTC AAC TTC GAT GTC TCA     622
177 T   K   A   L   F   L   N   E   D   Y   F   N   F   D   V   S     192

623 GCT TCC AAA ACA ACG TTT CCA CAC GGA TAC AGC TGC ATT AAT CAA ACT     670
193 A   S   K   T   T   F   P   H   G   Y   S   C   I   N   Q   T     208

671 GTT TCT TCA ACA TCA TTA GAG GTG CCG TTG GTG CCT GAA GGT GGA GCT     718
209 V   S   S   T   S   L   E   V   P   L   V   P   E   G   G   A     224

719 GTG ACG ACG ACG AAT GCA ACA CCA GCC GTG CAG CTG TCA CCG GCG GAG     766
225 V   T   T   T   N   A   T   P   A   V   Q   L   S   P   A   E     240

767 AGG GAG GCT AGG GTT TTG AGG TAT AGA GAG AAG AGG AAG AAT CGG AAG     814
241 R   E   A   R   V   L   R   Y   R   E   K   R   K   N   R   K     256

815 TTC GAG AAG ACG ATT AGG TAT GCA TCA CGT AAA GCA TAC GCC GAG GTT     862
257 F   E   K   T   I   R   Y   A   S   R   K   A   Y   A   E   V     272

863 AGG CCG AGG ATC AAG GGA CGT TTC GCT AAA CGA ACT GAT TCA AGA GTT     910
273 R   P   R   I   K   G   R   F   A   K   R   T   D   S   R   V     288

911 AAT GAT GGA GGA GGA GAC GTC GGA GTC TAC GGT GGG TTC GGA GTG GTC     958
289 N   D   G   G   G   D   V   G   V   Y   G   G   F   G   V   V     304

959 CCG AGT TTC TGA GTC TTT CTT CAG TGT CAA GTT GTA AGA AAC ATT GAT    1006
305 P   S   F   *                                                     307

1007 GAT GGT AAT AAG TAA CGG TTT TGA TAA AAA AAA AAA AAA AAA A        1049
```

그림 1. 무 (*Raphanus sativus*) *CONSTANS*-homologue cDNA 염기서열 및 아미노산 서열

```
CO-homologue:   4 RLCDSCRSAAATLYCRADAAFLCGECDGKIHTANKLASRHERVLLCQICEQAPAHVTCEA 63
                  R CD+CRS A T+YC AD+A+LC  CD ++H+AN++ASRH+RV +C+ CE+APA   CEA
CONSTANS:      18 RPCDTCRSNACTVYCHADSAYLCMSCDAQVHSANRVASRHKRVRVCESCERAPAAFLCEA 77

CO-homologue:  64 DAAALCVTCDRDIHSANPLSRRHERVSVTP 93
                  D A+LC  CD ++HSANPL+RRH+RV + P
CONSTANS:      78 DDASLCTACDSEVHSANPLARRHQRVPILP 107

CO-homologue: 235 QLSPAEREARVLRYREKRKNRKFEKTIRYASRKAYAEVRPRIKGRFAKR 283
                  QLSP +REARVLRYREKRK RKFEKTIRYASRKAYAE+RPR+ GRFAKR
CONSTANS:     300 QLSPMDREARVLRYREKRKTRKFEKTIRYASRKAYAEIRPRVNGRFAKR 348
```

그림 2. 무 *CO*-유사 cDNA와 애기장대 *CONSTANS* 유전자 사이의 아미노산 유사성 비교. 무 *CO*-유사 cDNA의 zinc finger 부위 (4-93 아미노산)와 C-말단 부위 (235-283 아미노산)를 애기장대의 동일 부위와 비교.

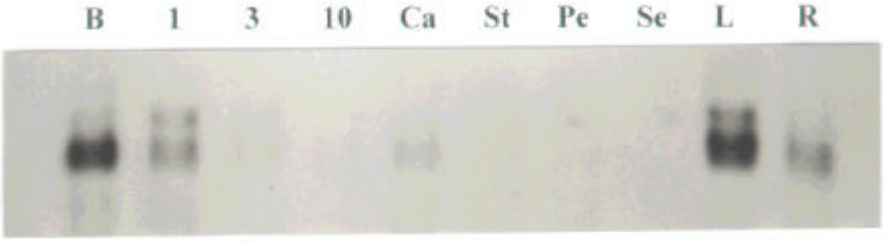


그림 3. *RsCO*의 RNA blot **분석**. B; bolting stage **화아**, 1; 1mm **화아**, 3; 3-5mm **화아**, 10; 10mm **아성 화아**, Ca; **암술**, St; **수술**, Pe; **꽃잎**, Se; **꽃받침**, L; **잎**, R; **뿌리**.

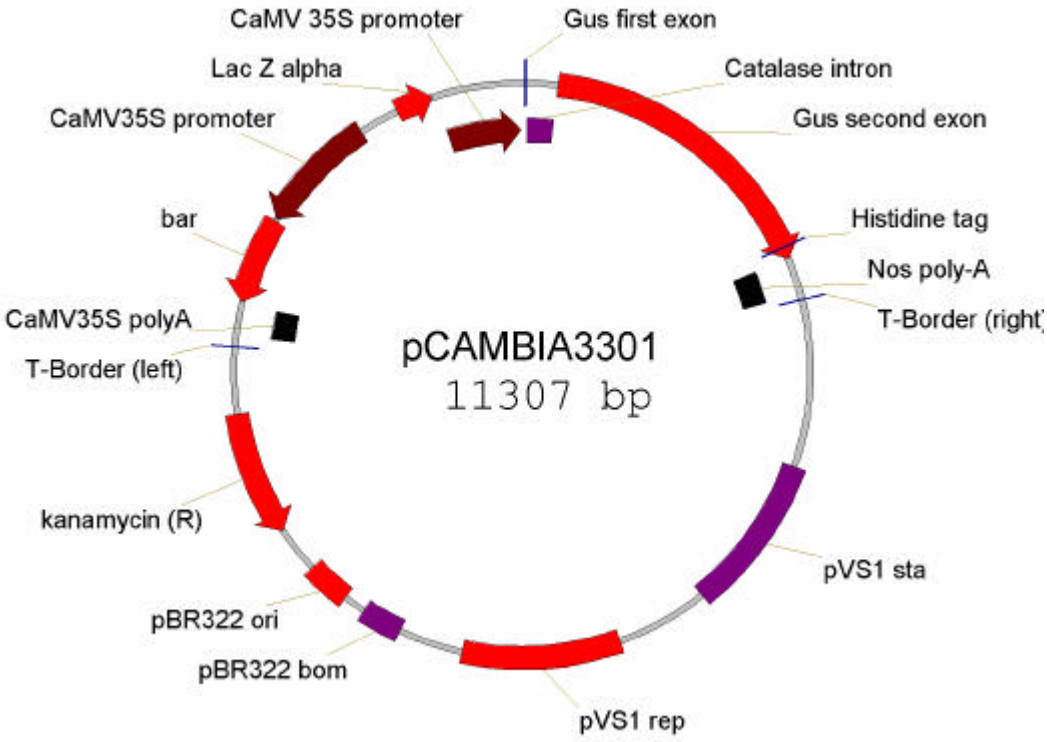
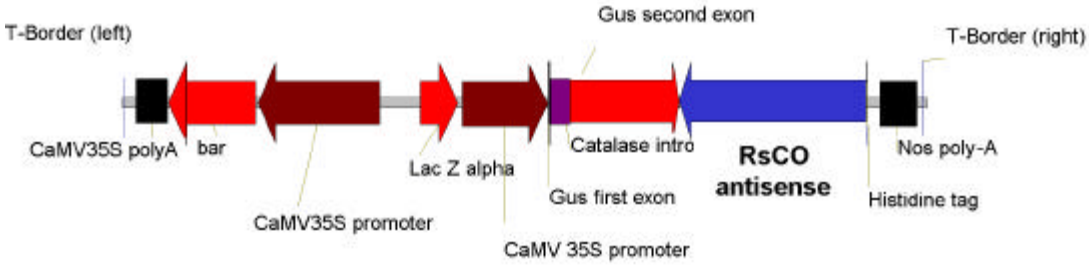


그림 4. 형질전환 및 유전자 조작에 사용한 pCAMBIA 3301 vector의 지도

그림 5. pCAMBIA3301-anti-RsCO construct의 T-DNA 부위의 지도



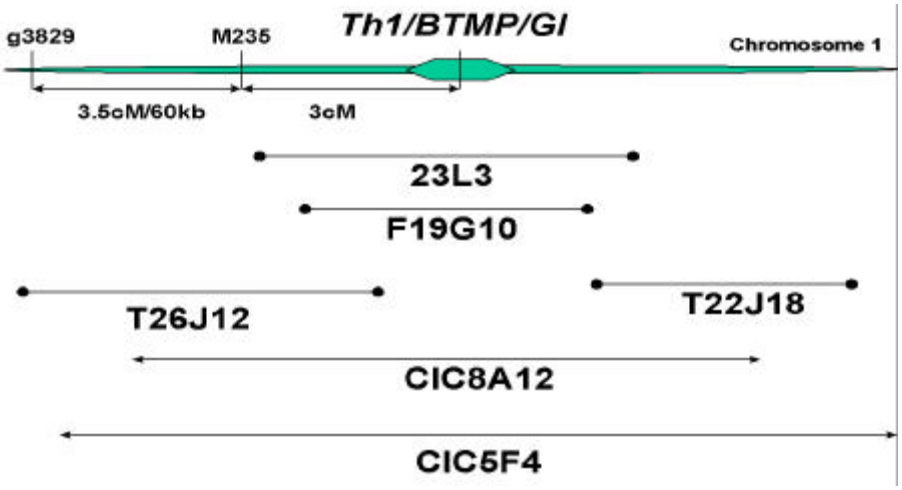
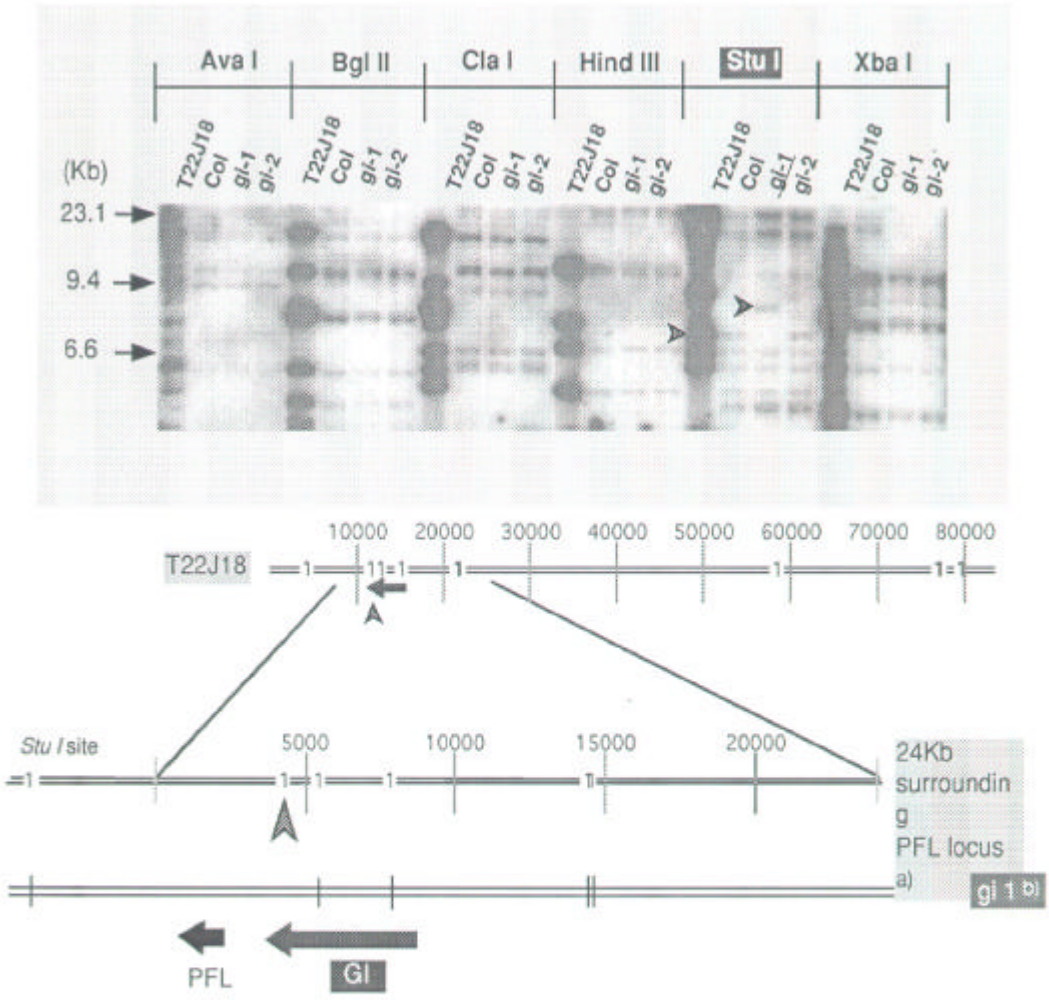


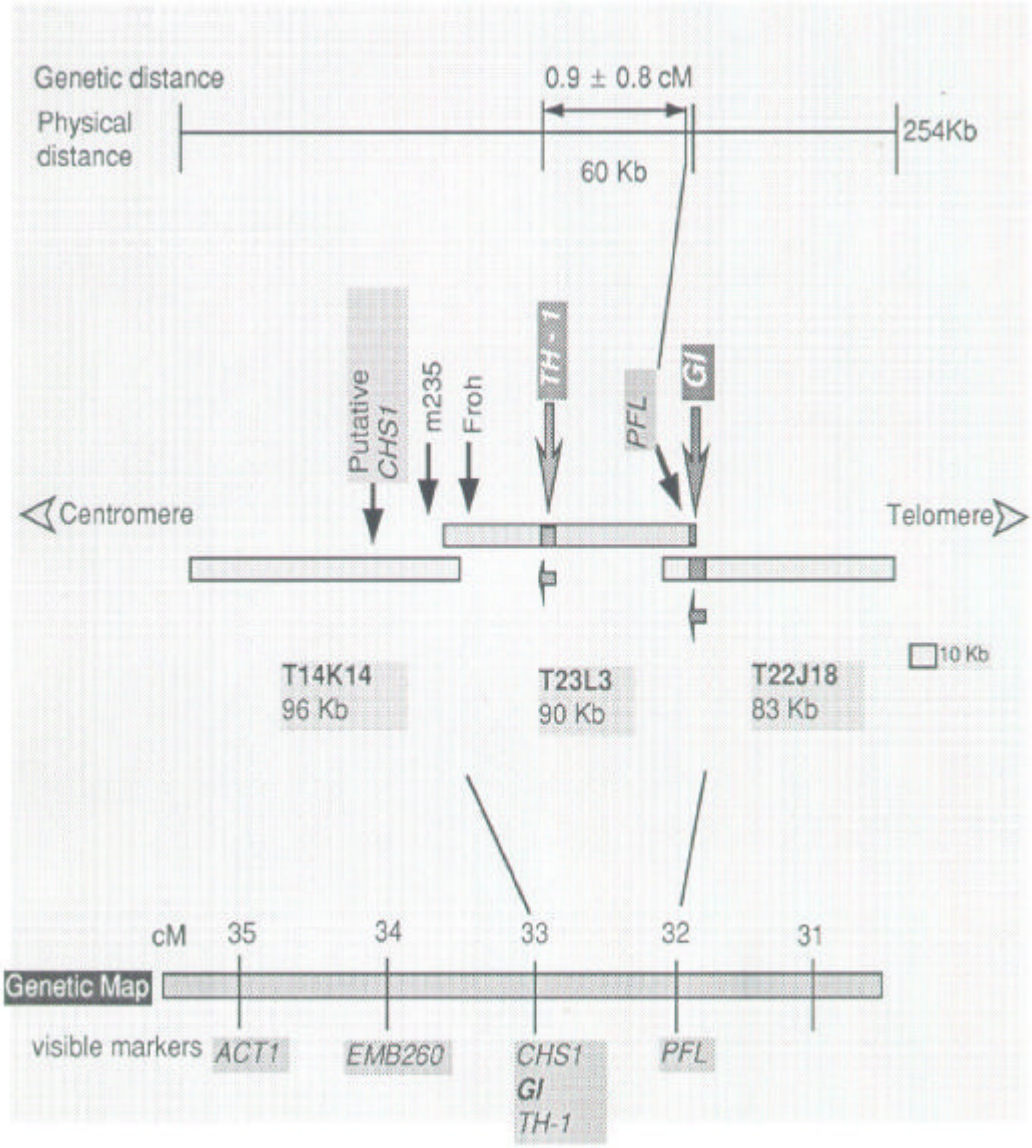
그림 6. Arabidopsis *thi* **유전자 주변의** contig map



a) The region was previously sequenced by research team of Dr. Van Montagu, M.

b) The gi 1 mutant genome showed an altered RFLP pattern using Stu I. A 8.2 Kb band appeared while a 7.1 Kb band disappeared simutanaously. The 8.2 Kb band resulted from combination of 1.1 Kb and 7.1 Kb bands by disrupting a Stu I site. The disappeared 1.1 Kb band of the gi 1 allele is not displayed this figure.

그림 7. RFLP analysis of *gi* mutants, *gi-1 and gi-2*



1. The BAC clone, T23L3 has the TH1 gene and partial GI gene. The T22J18 BAC clone have the intact GI gene.

그림 8. GI **유전자에 인접한** BAC contig

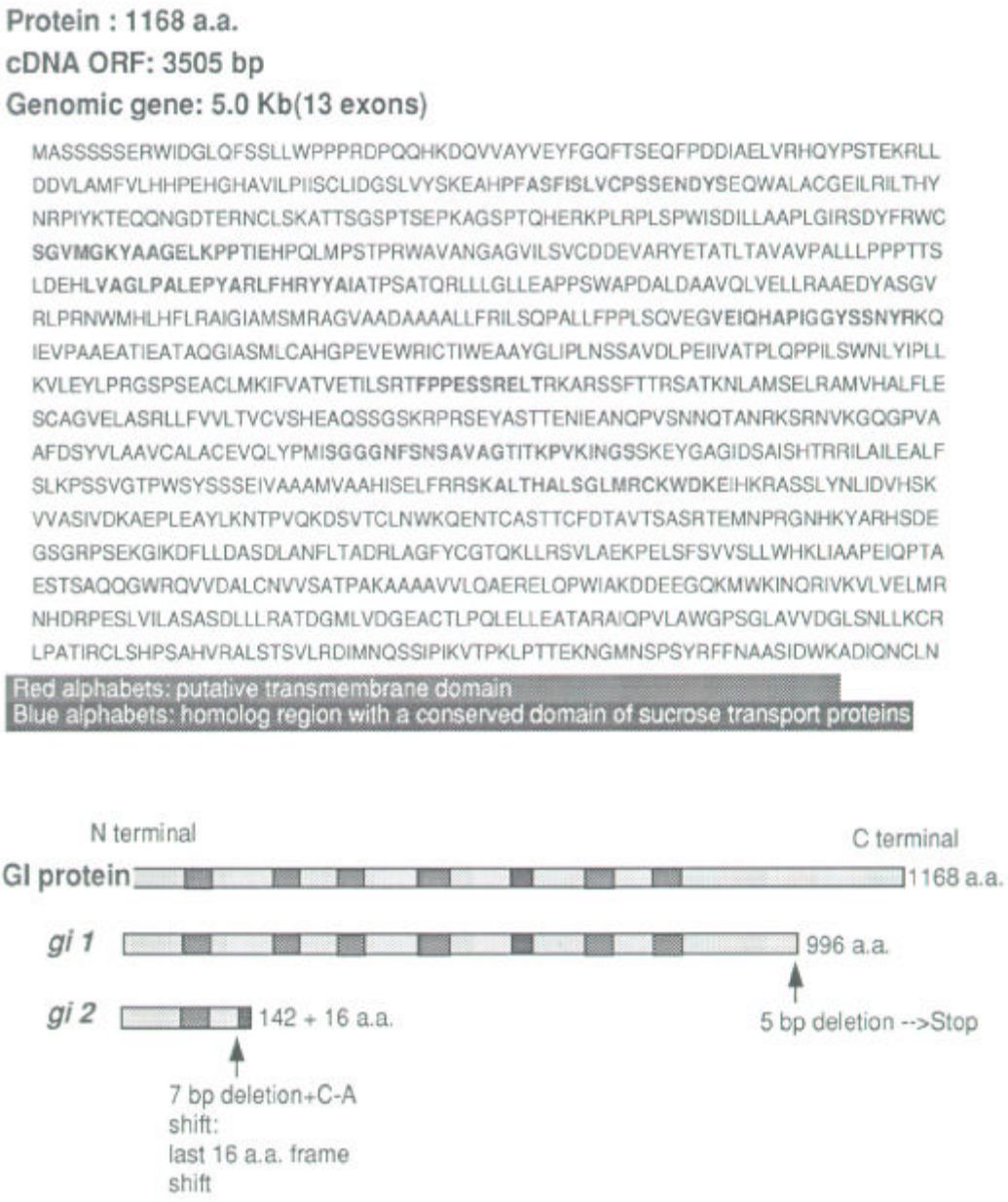


그림 9. GENESCAN**으로 유추한** GI **단백질의 구조**

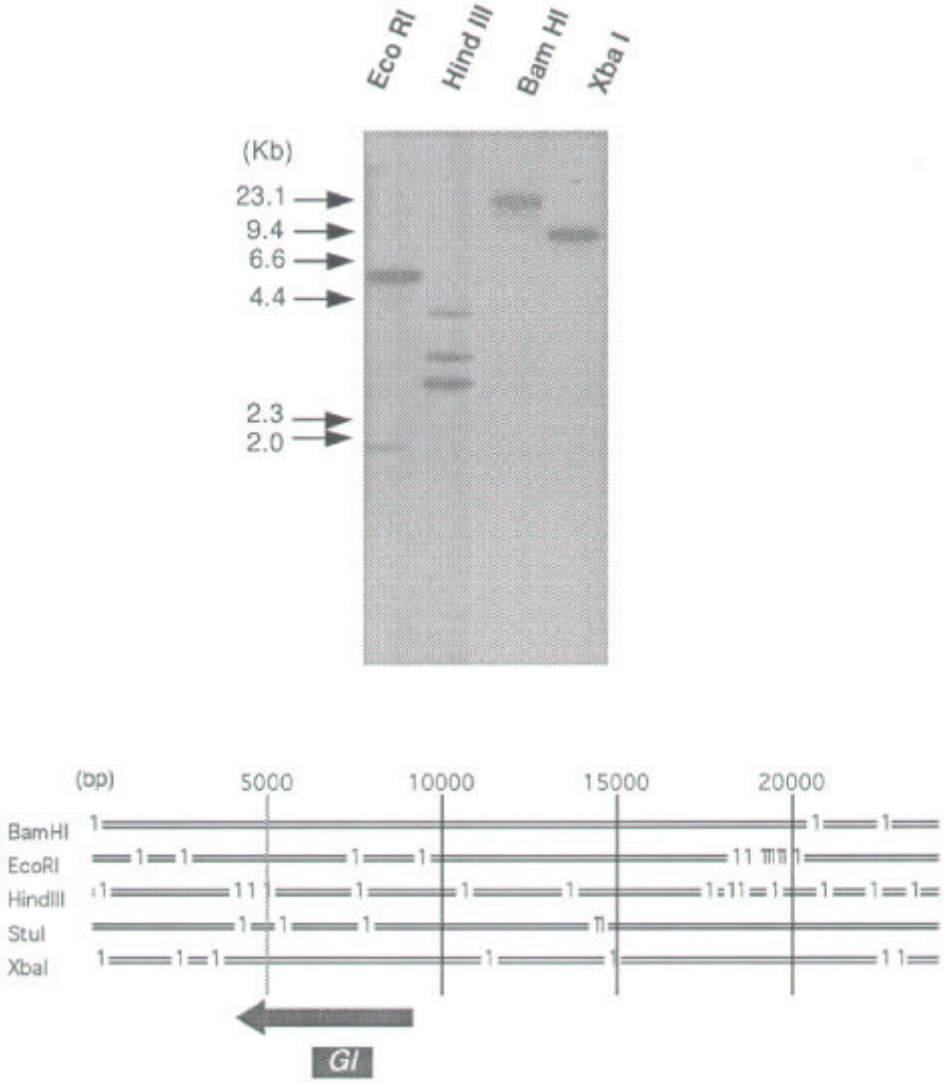


그림 10. GI **유전자의** southern **분석결과**

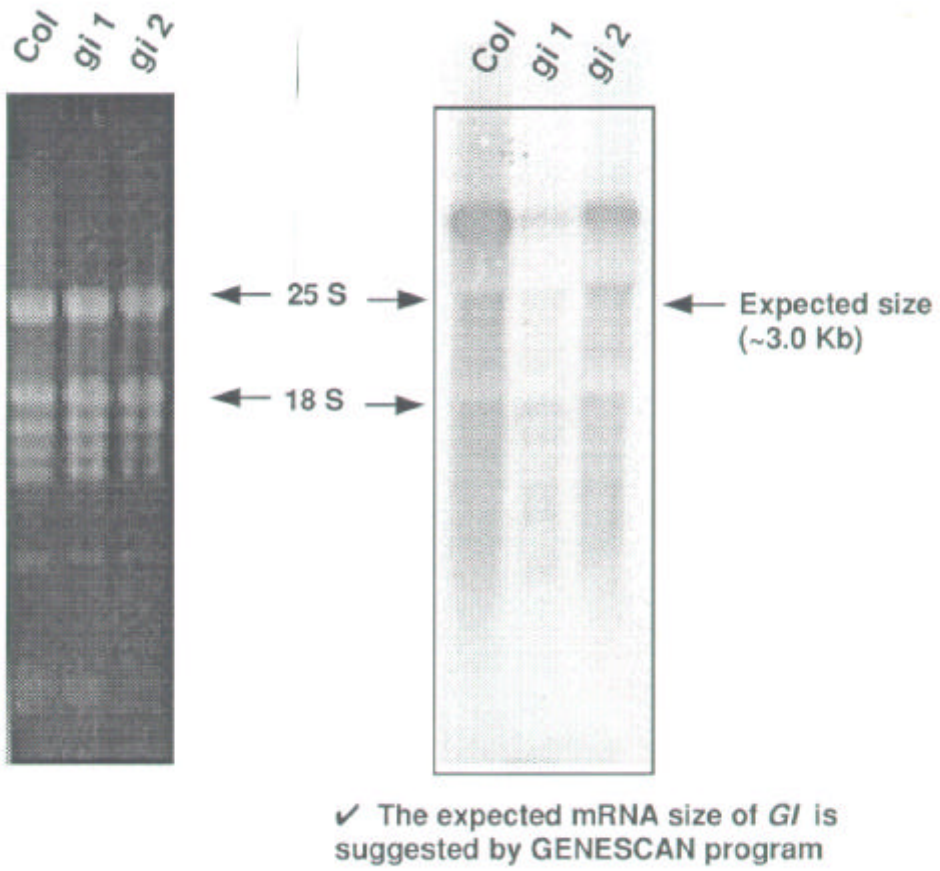


그림 11. *GI*[Col], *gi* 1, *gi* 2 mutants**의** northern **분석 결과**

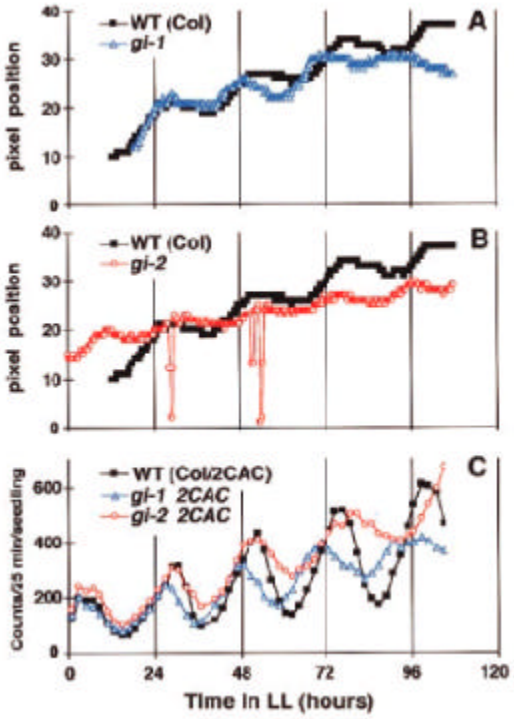


Fig. 12. Representative traces of (A and B) circadian rhythms of leaf movement and (C) *cab2::luc* expression in wild-type (WT), *gi-1*, and *gi-2* mutant backgrounds under constant white light (LL). Plants were germinated and grown for 6 to 7 days under light and dark cycles as previously described before they were transferred to continuous white light for 110 hours. Leaf movements were recorded, and luminescence assays were conducted to obtain period estimates as previously

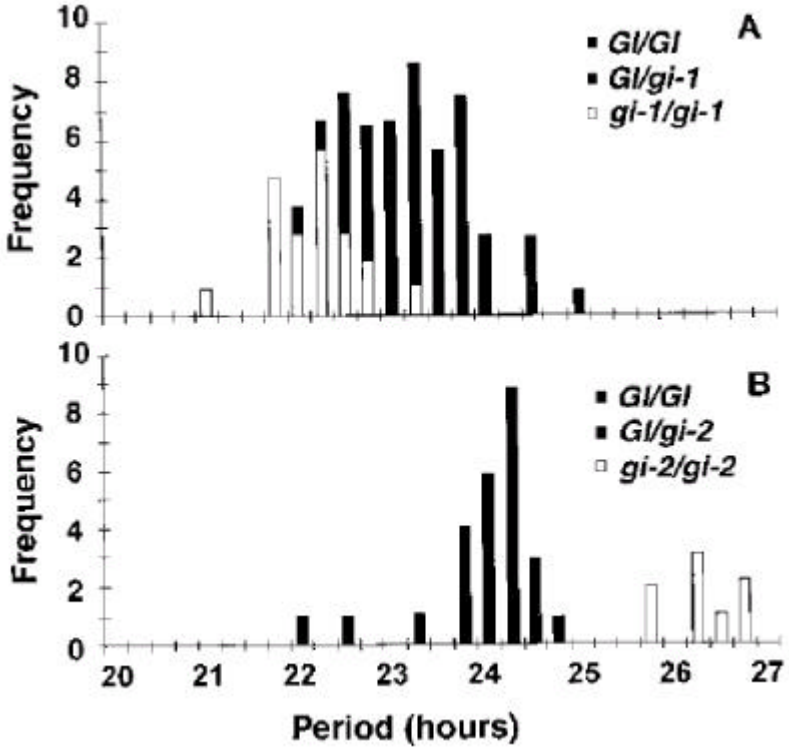


Fig. 13. Period length distribution in F 2 populations segregating for (A) *gi-1* or (B) *gi-2*. Plants were entrained and assayed as describedin Fig. 1. Period bins are labeled with the upper bound.

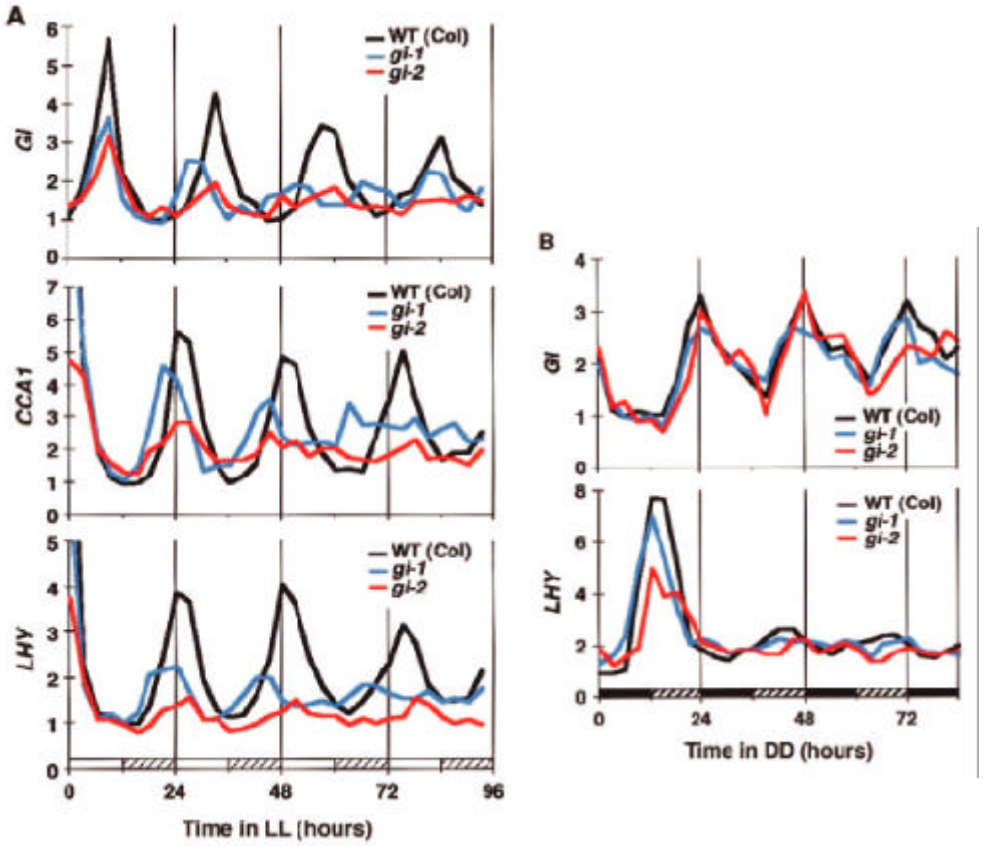


Fig. 14. Circadian expression of the *GI*, *CCA1*, and *LHY* genes in (A) continuous light or (B) continuous darkness in wild type, *gi*-1, and *gi*-2. Plants were entrained in 12 hours of light and 12 hours of dark cycles for 2 weeks before transfer to continuous light (LL) or dark (DD). The open and hatched boxes in (A) represent the subjective day and night, respectively. The solid and hatched boxes in (B) represent the subjective night and day, respectively. Seedlings were sampled every 3 hours, and RNA expression levels were measured by dot blotting. The *Brassica BGB1* clone corresponding to the *Arabidopsis AtarcA* gene was used as a control. Values are normalized to the lowest value of the wild-type samples in each set. The LL and DD experiments were performed three times and twice, respectively. Representative data are shown.

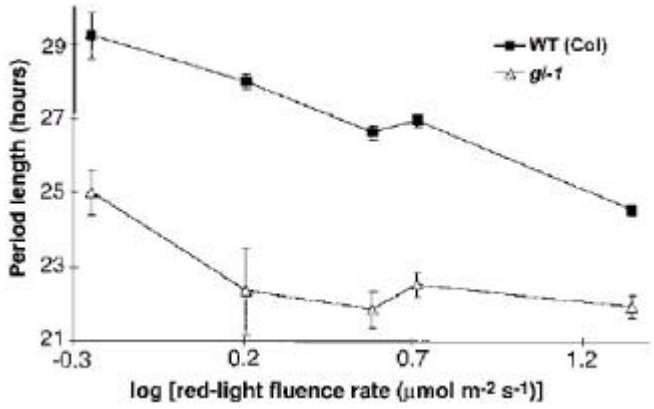


Fig. 15. Effect of red-light ?ence rate on free-running period length of *cab2::luc* expression in the wild type and the *gi-1* mutant. Seedlings were entrained as described, then transferred for < 110 hours to continuous red light(600 to 700 nm) at the fluence rates indicated. Period estimates were obtained as previously described. Error bars indicate 6SEM*(n* 5 8 through 20). Representative data are shown from two independent experiments with similar results.

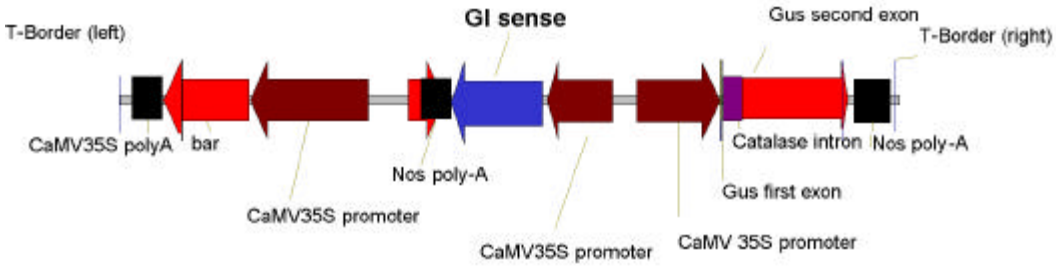


그림 16. pCAMBIA3301:GI construct**의** T-DNA **부위의 지도**

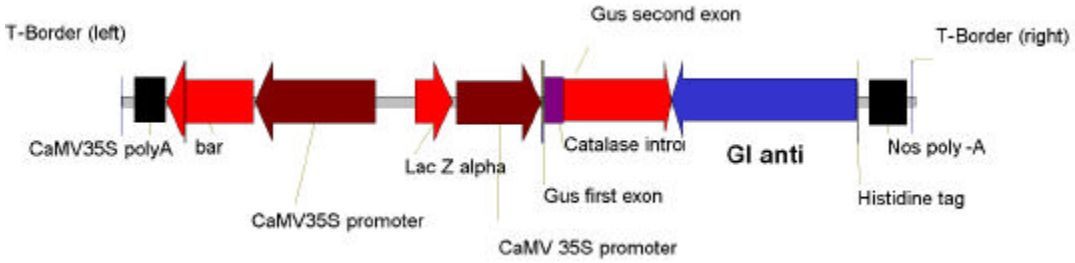


그림 17. pCAMBIA3301:GI construct의 T-DNA 부위의 지도

Effect of the GI overexpression in wild-type (Col)

pNB96 ---- dual 35S promoter
cDNA ----- Full length (~3.5 kb)
gene ------- 5 kb

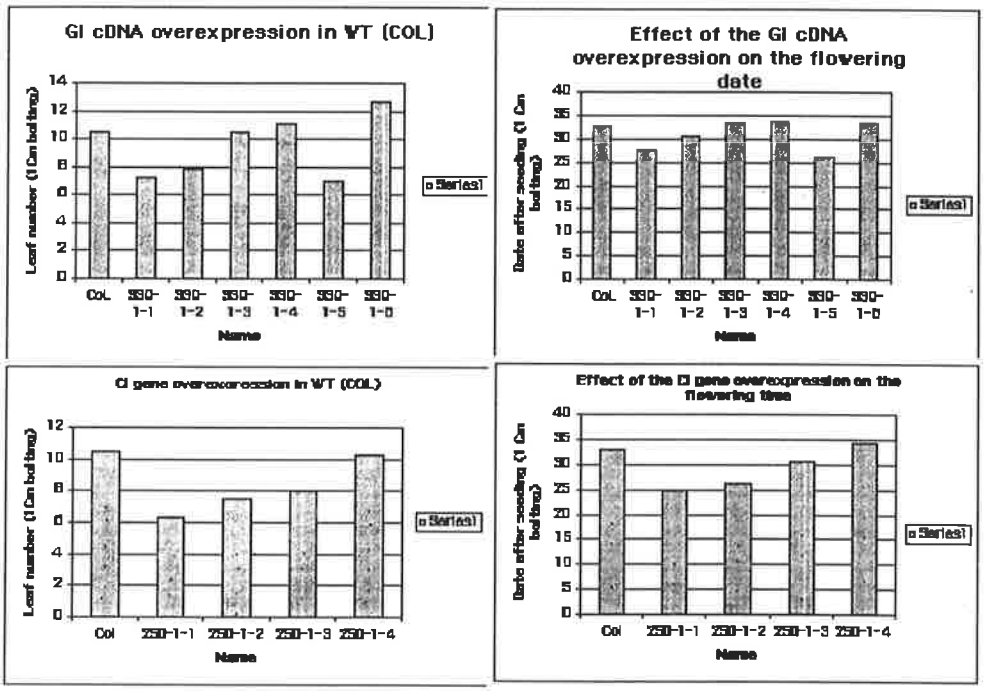


그림 18 GI sense over-expersion에 의한 개화시기 변화

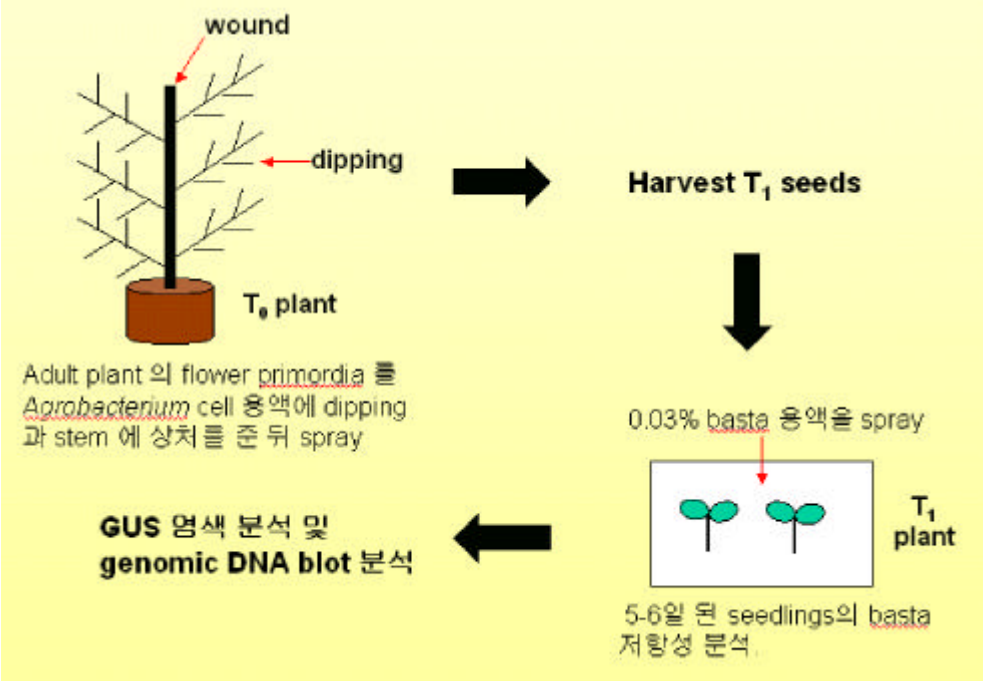


그림 19. Floral dipping 방법에 의한 형질전환 과정의 모식도

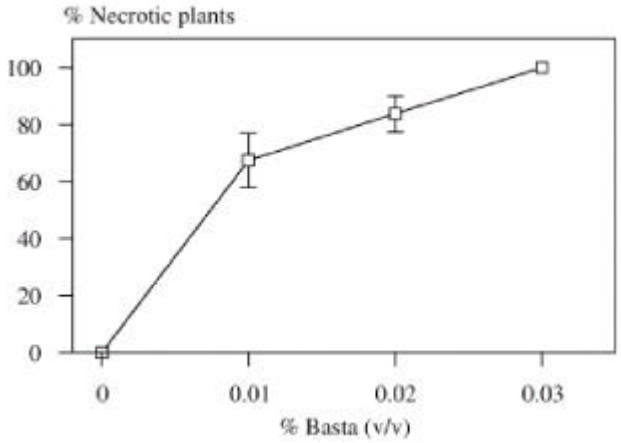


Figure 20. Basta의 농도에 따른 necrotic plants 생성율

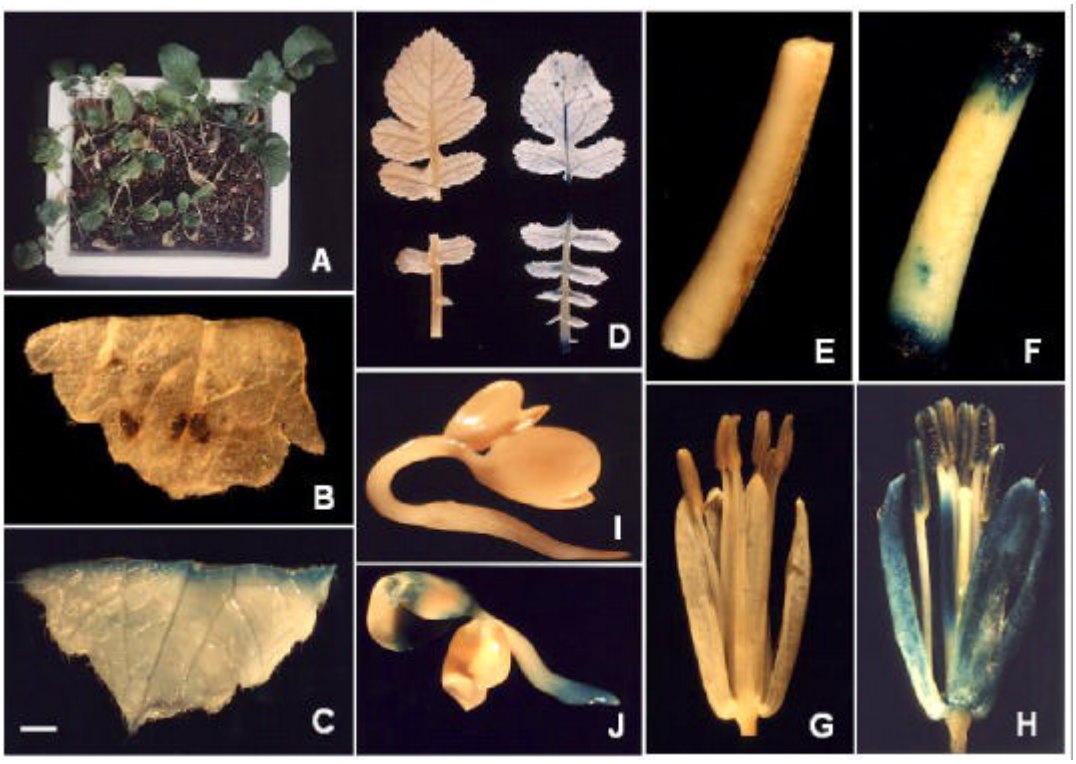


그림 21. Floral dipping **방법에 의해 생성된 형질전환체의 주위별** GUS **분석결과**

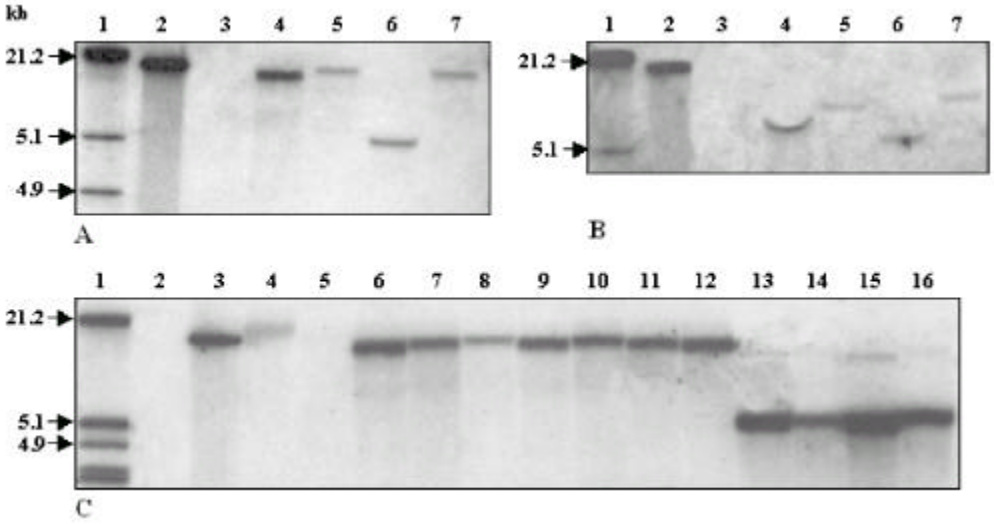


그림 22 Southern blot analysis of genomic DNA from T1 transformed radish.

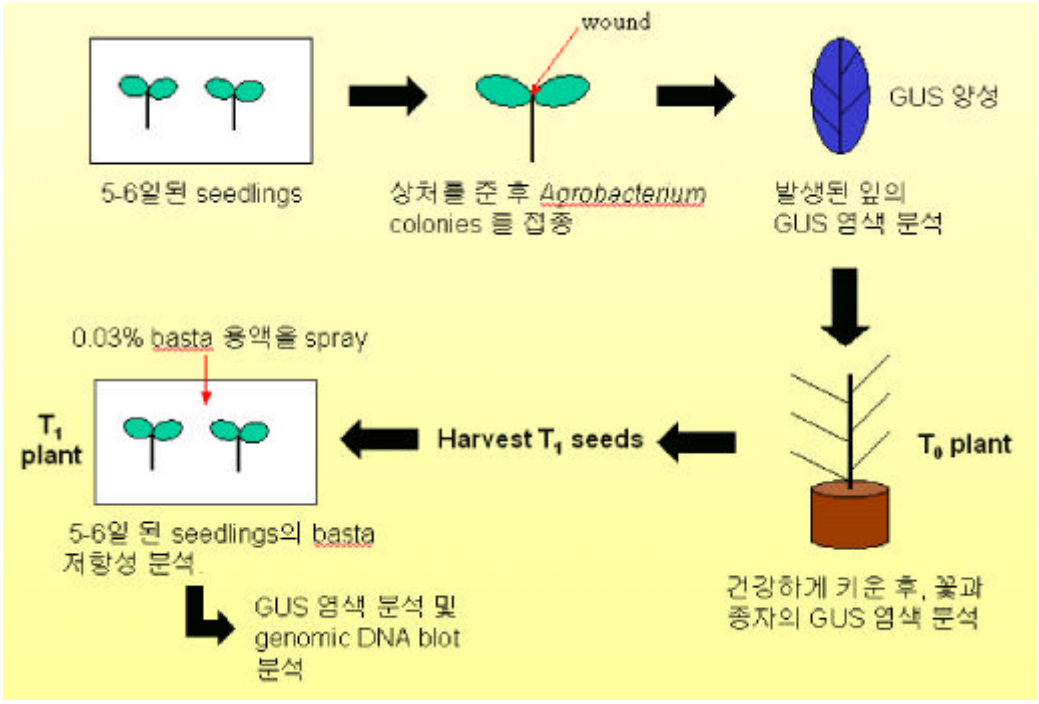


그림 23. *In planta* **방법에 의한 형질전환 과정의 모식도**

그림 24. transgenic line**의 잎, 꽃, 종자의** GUS **분석 결과**

그림 25. transgenic line**의 형질전환** 1**세대의** basta **저항성 분석 결과**

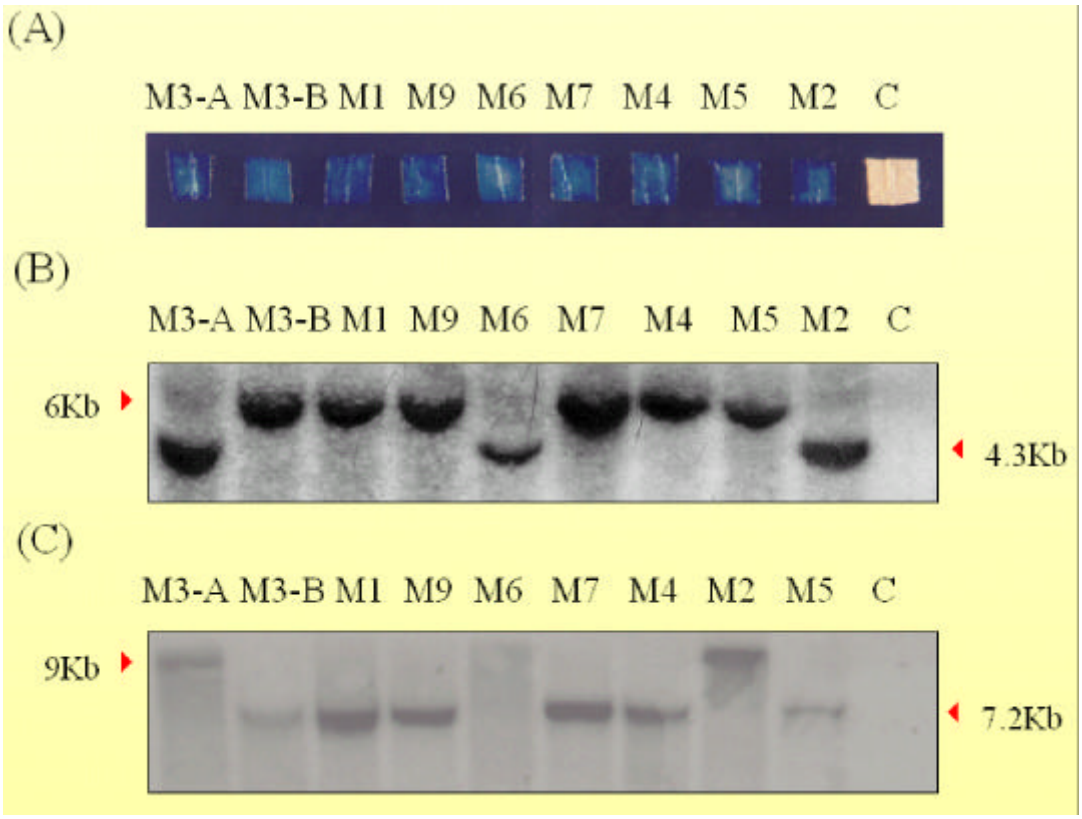


그림 26. transgenic line**의** southern **분석 결과**

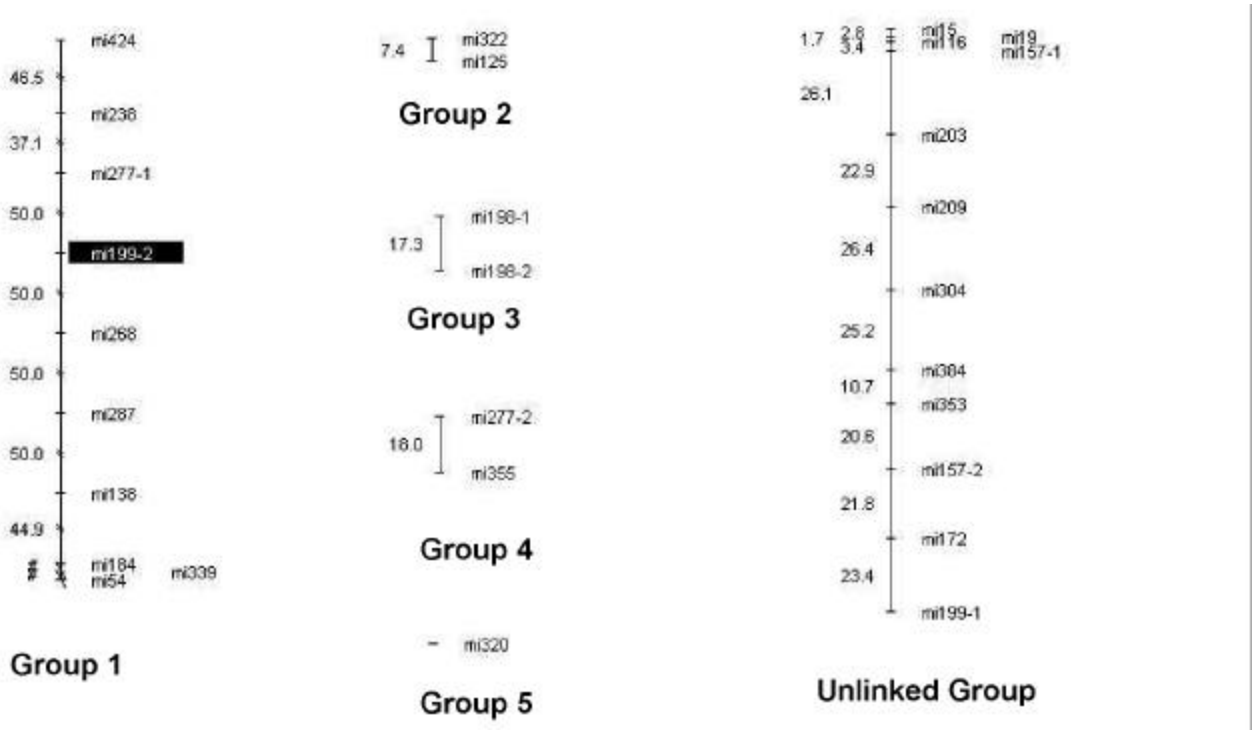


그림 27. 분석중인 무의 분자표지 지도

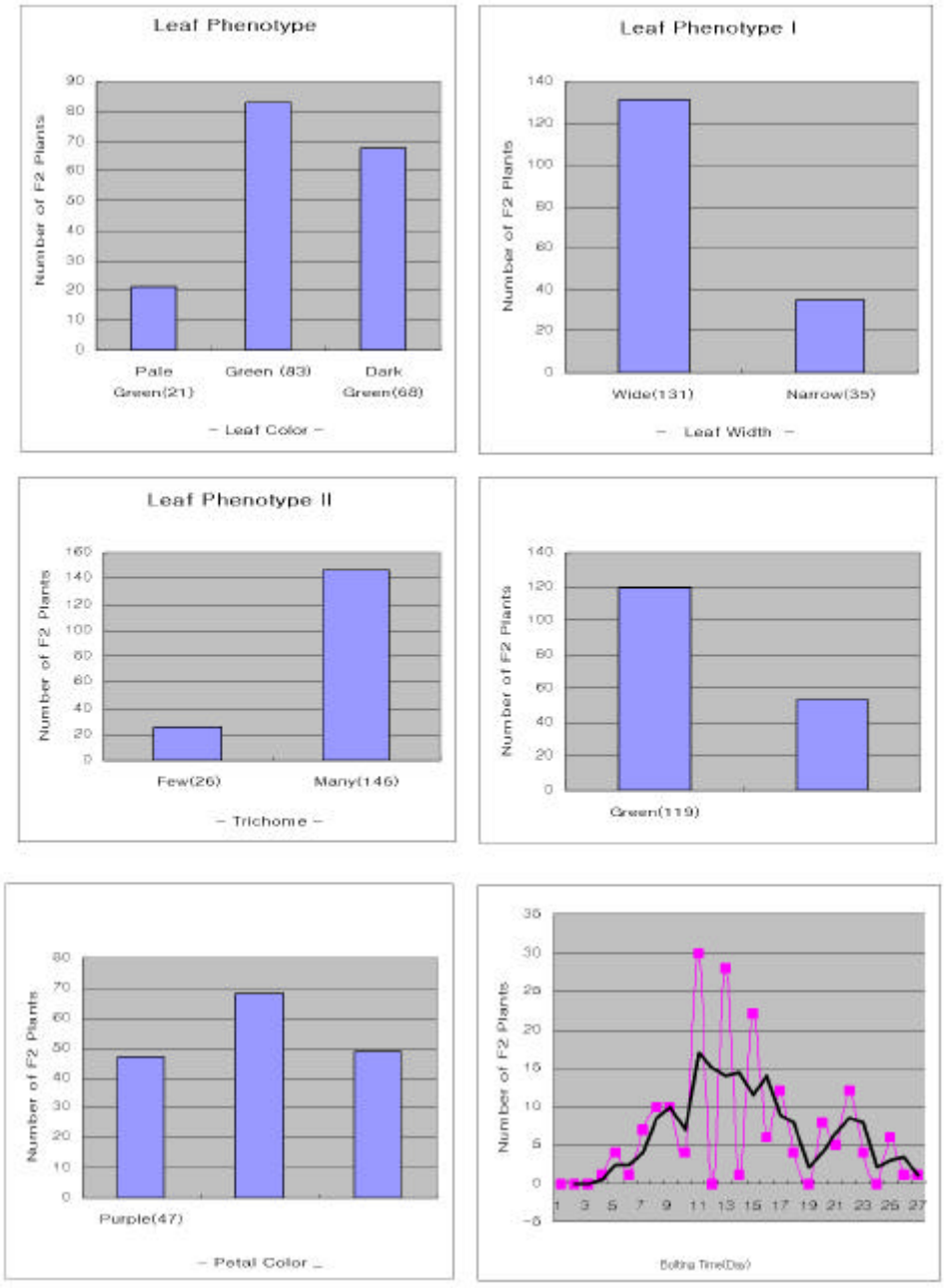


그림 28. 조사된 각종 형질 및 추대 형성시기의 자료

제 4 장 결 론

무는 김치의 주 재료로서 우리 국민 식생활에 필수적인 중요한 채소이다. 1995년 재배면적이 35,518 ha로 채소 전체 면적의 8.8%, 생산량은 1,435,296 M/T로 전체 채소 생산량의 13.6%를 차지하고 있으나 봄무의 경우 꽃이 일찍 피어 가을무에 비해 품질이 떨어지는 문제점을 안고 있다. 무와 같은 십자화과인 애기장대의 경우 개화관련 유전자와 돌연변이에 대하여 많이 연구되고 있고, 그 중에서도 특히 *co* 와 *gi* 돌연변이는 춘화처리나 생장호르몬 등에 영향을 받지 않으며, 장일 조건에서만 개화시기가 3-5배 늦어지는 특징을 가지고 있다. 본 연구에서는 *GI*와 *RsCO*를 cloning하고 이를 antisense 방향으로 무에 도입함으로서 만추대성 무 품종을 개발하고자 하였다.

애기장대에서 map based cloning 방법으로 *GI* 유전자를 분리하여 생체시계와의 상관관계를 밝혔고, 애기장대의 *CO* 유전자의 염기서열을 이용하여 *RsCO* 유전자를 RT-PCR 방법으로 분리하였다. GI 유전자의 경우 3504bp, 1168개의 amono acid로 구성되어있으며, *gi-1* 및 *gi-2* 유전자의 경우는 각각 frame shift mutation과 nonsense mutation에 의해 *GI* 유전자의 기능을 상실하였음을 밝혔다. RsCO 유전자의 경우 307개의 amino acid를 갖고, AtCO의 염기서열과 90% 이상의 상동성을 보였으며 62%의 amino sequence identity를 보였다. 이들 유전자를 도입하여 만추대성 무 품종을 개발하기 위하여 pCAMBIA3301 발현벡터에 antisense 방향으로 cloning 하였다.

새로운 유전자 도입에 의한 만추대성 무를 개발하기 위해서는 적절한 형질전환 방법을 확보하여야한다. 본 연구에서는 기존의 조직배양법에 의한 형질전환 방법을 대체할 수 있는 floral dipping 및 *in planta*의 두 종류의 비조직배양적 형질전환법을 개발하여 도입된 유전자가 형질전환 2세대로 안정적으로 유전됨을 확인하였다. 무에 만추대성을 도입하기 위하여 pCAMBIA3301-anti-GI expression vector를 floral dipping 법에 의해 진주대평무에 도입하여 다수의 형질전환체를 확보한 후 개화시기에 대한 형질을 조사하였다. 형질전환 1세대에서 late flowering 형질을 보인 5종의 형질전환체 2세대(U, P, 12-2-E, S, R) 각 64 개체에 대하여 개화시기 분석을 한 결과 야생형이 51±10 일에 추대를 형성한 것에 비하여 각각 119, 124, 158, 124, 130 일에 추대를 형성하여 무에서 anti-GI 유전자의 발현이 개화시기 지연효과를 나타냄을 보였다. 따라서 GI 유전자를 이용한 만추대성 작물의 개발 가능성을 확인하였으며, 이는 무에만 국한 된 것이 아니라 추대성이 문제가 되는 다양한 작물의 만추대성 작물의 개발에 이용될 수 있을 것으

로 판단된다.

형질전환에 이용한 pCAMBIA3301 vector의 경우 GUS 유전자와 basta 저항성 유전자가 삽입되어있다. 이들 유전자가 형질전환된 식물체를 모본이나 부본으로 이용할 경우 기조의 동위효소법을 대체할 수 있는 잡종종자 검정 시스템을 손쉽게 확립할 수 있을 것이다.

무 분자표지 지도도 본 연구과제를 통하여 개발되고 있다. 고전 육종으로는 무 육종시 장기간이 소요되어 다양한 기호 및 시장성 변화에 적극적으로 대체하기 어려우므로, 본 연구에서 개발된 분자표지는 향후 고전 육종기술을 보완하여 무 육종의 효율성을 확보하게 될 것으로 사료된다.

이러한 모든 연구결과는 향후 만추대성 무 품종 개발뿐만 아니라 더 나아가서는 다른 작물의 품종 개발에 큰 일익을 담당할 것으로 사료된다.

제 5 장 참고문헌

Stam P., 1993, Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap, The Plant J., 3(5), 739-744

Lister C. and Dean C., 1993, Recombinant inbred lines for mapping RFLP and phenotypic markers in Arabidopsis thaliana, The Plant J., 4(4), 745-750

Fabri C. and Schaffner A.R., 1994, An Arabidopsis thaliana RFLP mapping set to localize mutations of chromosomal regions, The Plant J., 5(1), 149-156

Hauge B. M. et al., 1993, An integrated genetic/RFLP map of the Arabidopsis thaliana genome, The Plant J., 3(5), 745-754

Reiter R. S. et al., 1992, Global and local genome mapping in Arabidopsis thaliana by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs, Proc. Natl. Acad. Sci (USA), 89, 1477-1481

Putterill J. eetal., 1995, The CONSTANS gene of Arabidopsis promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors, Cell, 80, 847-857

Lagercrantz U. et al., 1996, Comparative mapping in Arabidopsis and Brassica, fine scale genome collinearity and congruence of genes controlling flowering time, The Plant J., 9(1), 13-20

Dennis E. S. and Leewellyn, 1991, Molecular approaches to crop improvement,

Springer Verlag Inc., New York, U. S. A.

Gasser C. S. and Fraley R. T., 1989, Genetically engineering plants for crop improvement, Science, Vol.224, P. 1293-1299

Goodman et.al., 1987, Gene transfer in crop improvement, Science, Vol. 236, P.48-54

Lycett G. W. and Grierson D., 1990, Genetic engineering of crop plants, Butterworth Inc., London, U.K.

Ratner M., 1989, Crop Biotech '89, Bio/Technology, Vol. 7, P. 337-341

Martin, S.J. and Green, D.R. (1995) Protease activation during apoptosis : death by a thousand cuts? Cell 82, 349-352

Mariani, C., De Beuckeleer, M., Truettner, J., Leemans, J., and Goldberg, R.B. (1990) Induction of male sterility in plants by a chimeric ribonuclease gene. Nature 247, 737-741

McClure, B.A., Gray, J.E., Anderson, M.A., and Clarke, A.E. (1990) Self-incompatibility in Nicotiana alata involves degradation of pollen rRNA. Nature 347, 757-760

Vasil I. K., 1990, The reality and challenges of plant biotechnology, Bio/Technology, Vol. 8, P. 296

송융남 등, 1990, **무우의 추대 및 개화생리에 관한 연구** XI, **원예학회지**, 31(3), 193-198

박병훈 등, 1990, **무의 추대 및 개화생리에 관한 연구** XII, **원예학회지**, 31(4), 334- 339

윤화모, 1996, **일대잡종 무 품종 "원교 108호" 양친증식을 위한 자가불화합성의 일시적 타파**, **육종학회지**, 28(1), 92- 97

농축산물 수입 개방에 따른 과학기술 중장기 계획 (**상**), 1991, **농촌진흥청**, **수입개방대책** 50.

농축산물 수입 개방에 따른 농업 과학기술 연구 개발 중장기 계획 (**하**), 1991, **농촌진흥청**, **수입 개방대책** 71.

제 6 장 위탁과제

무 재분화 및 형질전환 체계확립 분야

제 1절 서 론

십자화과에 속하는 무(*Raphanus sativus L*)는 김치의 주재료로써 원예적인 중요성은 대단히 크다. 우리나라는 무 품종 육성에 있어서는 세계적이며 심지어는 일본으로 많은 양의 종자를 매년 수출하고 있다. 무의 품질향상, 특히 추대와 관련해서 많은 형질들이 개선된 우수한 무 품종이 나왔지만, 아직까지도 재배중에 발생하는 무의 추대(먼저 꽃눈이 생기고 꽃대가 올라오는 현상) 는 품질에 미치는 큰 요인으로 작용하고 있다. 이러한 문제는 추대와 관련된 유전자의 발현기작을 조작함으로써 조절이 가능할 것으로 알려져 있다. 최근 새로운 특정한 유전자를 식물체 내로 전이시켜 그 유전형질을 발현시키는 형질전환 연구가 여러 작물을 대상으로 이루어지고 있다.

그 방법으로는 자연상태에서 세포에 잘 침입하는 병원성 박테리아인 *Agrobacterium tumefaciens* 나 *Agrobacterium rhizogenes*를 이용하는 *Agrobacterium vector*와 식물 절편을 cocultivation(공동배양)하는 방법, 식물세포막에 전기적 충격으로 막투과성에 일시적 변화를 주어 외래형질을 삽입하는 electroporation법, 분리 정제된 DNA를 미세한 유리관을 이용하여 식물의 세포나 조직으로 직접 주입하는 microinjection법, 그리고 최근에 많이 이용되고 있는 미세금속입자에 DNA를 coating한 후 이를 운반체로 이용 particle gun의 강한 압력으로 식물체 조직이나 배양체에 직접 쏘아 삽입하는 particle bombardment법, 원형질체를 분리한 후 PEG와 같은 화학물질의 매체 속에서 주입되도록 유도하는 등의 방법이 있다. 이렇게 여러 가지 형질전환하는 방법들 중 가장 보편적이며 안정한 형질전환 방법은 *Agrobacterium*을 이용하는 방법으로 알려져있다. 이런 방법을 통해 특정한 유전자 식물체 내로 도입하여 재배된 담배를 비롯한 많은 작물이 실제로 상품화 되어서 판매되고 있지만 무의 경우는 체세포 조직으로부터 완전한 식물체 재분화가 어렵다고 알려져서 이러한 유전공학적 접근이 사실 불가능하다고 여겨져 왔다.

Agrobacterium vector를 이용한 식물의 형질전환의 연구에서는 우선 Agrobacterium과 cocultivation(공동배양)된 식물의 조직절편으로부터 재분화 되는 식

물체의 획득빈도를 높이는 것이 무엇보다도 중요하다. 기존의 본 연구실의 경험을 토대로 본 연구에서는 무의 재분화 조건과 Agrovbacterium에 의한 형질전환 체계조건을 확립하므로서 무의 잡종세대로의 만추대성 개화 조절유전자를 도입 및 발현을 확인하고자 수행되었다.

제 2절 무 재분화 체계 확립

1. 실험 재료 및 기내 파종

중앙종묘에서 분양받은 inbred line인 N78과 경신종묘와 동부한농에서 분양받은 고정종인 진주대평을 70% EtOH에 5분동안 침지하여 1차 표면소독 한 후, 멸균수로 3회 세척하고, 30% 락스에 10분간 소독한 다음, 다시 멸균수로 3회 세척하였다. 소독된 종자를 멸균 처리된 고체 발아배지(1/2 Murashige and Skoog medium, 1% sucrose, 0.8% Agar, pH 5.6-5.8)에 파종하고 암상태에서 1-2일동안 발아시킨 후, 16시간 명상태와 8시간 암상태 , 온도 25℃± 1조건의 배양실에서 3-4일 배양하였다.

2. 절편부위 및 재분화 배지

N78의 경우에는 4주정도 배양된 모식물체로부터 얻은 본엽과 엽병을 실험재료로 사용하였으며, 진주대평의 경우에는 5-6일 후 파종된 종자로부터 얻은 자엽과 하배축부위를 1㎝정도 크기로 잘라 절편체로 사용하였으며, 자엽과 하배축부위를 제거한 후 생장점부위는 2% sucrose가 포함된 Murahige & Skoog medium에 계대배양하여 배양하였다. 절편체의 생장조절제 흡수효과를 높이기 위해 메스를 이용하여 엽맥 1곳에 상처를 내어 실험에 사용하였다. 재분화 기본 배지로는 Murahige & Skoog medium, 2% sucrose, 0.8% Agar, pH 5.6-5.8를 사용하였으며, 절편체의 공간 확보를 위해 한 개의 plastic petridish에 자엽은 10개체씩, 하배축은 13-15개체씩 절편체를 치상하고, 절편제의 원활한 호흡을 위해 vinyl wrap으로 감은후, 배양실에서 배양하였다. 배양된 젊편체들은 4주마다 새로운 petridish와 신선한 배지로 옮겨져 배양되었다.

3. 재분화

가. N78의 재분화

무 재분화 실험에 있어서 기초자료로 도움을 주고자 실험하였다. 인위적 환경내 절편체를 이용한 조직배양에서 식물체 재분화를 위해 식물생장조절제를 처리할 때는 절편체의 내생 호르몬양에 영향을 주는 모식물체의 유전조성, 생장조건 및 절편체 채취시기, 부위 등에 따라 농도를 다르게 처리하는 것이 일반적이다. 식물생장조절제인 Auxin, cytokinin, abscisic acid, ethlene 등은 이들 간의 상호작용에 의해 그 효과가 촉진 또는 억제되는데 이중 shoot분화에는 auxin과 cytokinin의 상호작용이 가장 중요하다는 보고이후 이들에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 조직배양에서의 auxin은 callus 유기촉진, 엽록체 형성 억제, 뿌리 및 shoot 형성 촉진 등 배발생을 촉진하는 역학을, cytokinin은 세포분열 촉진, 직·간접적인 shoot 및 axillary shoot 유기 촉진,뿌리형성 억제 등의 효과를 가진다.auxin류인 NAA, 2ip, Pic 와 cytokinin는 BAP를 농도별로 처리하여 shoot분화정도를 조사 관찰하였다. NAA 1.0 ㎎/l와 BAP 5.0㎎/l 조합에서만 shoot분화율이 24%을 보인 반면 다른 조합에서는 shoot의 양상을 관찰할 수 없었다. 이결과를 통해 NAA가 무 작물에 있어서 가장 효율적 auxiu류임을 알 수 있었다(표1). BAP와 NAA의 조합을 좀더 세분화 한 농도별로 처리하여 적정한 농도조건을 찾고자 수행하였다(표2).또한 1971년 Larue에의해 식물의 기내배양과정에서 에틸렌이 배양체의 생육에 영향을 끼친다는 것이 보고되었고, 식물체에 사용가능한 에틸렌 활성억제들이 연구되기 시작하면서 Ag+이온이 식물체에서 발생되는 에틸렌의 활성억제에 가장 효과적이라는 것이 밝혀졌다. 이 결과를 바탕으로 에틸렌에 의해 기내 재분화가 억제되는 것으로 생각되는 꽃양배추, 배추, 감자 등의 작물에 AgNO₃를 첨가하여 에틸렌의 활성을 활성을 억제함으로써 재분화율 및 형질전환율을 향상시킨 사례가 보고되기 시작하였다. 이러한 보고를 기초로 무의 shoot분화에 있어서 적정 생장조절제 농도와 에틸렌 억제제인 질산은(AgNO₃)를 처리하여 그 양상을 관찰하였다(표2). 지금까지의 실험을 토대로 BAP농도를 5.0 ㎎/l로 고정시킨 다음 , NAA 0.5 - 1.0 ㎎/l 와 AgNO3 0, 1.0, 2.0, 3.0 ㎎/l 혼용처리 한 결과는 표3과 같다. N78에 있어서 가장 적절한 농도조건은 BAP 5.0㎎/l , NAA 1.0㎎/l, AgNO3 1㎎/l 임을 확인할 수 있었으며 15% 재분화율을 관찰할 수 있었다.(표3)

표1. N78 재분화에 있어서의 다양한 옥신류의 효과

BAP	NAA				2iP				Pic			
	0	1.0	2.0	5.0	0	1.0	2.0	5.0	0	1.0	2.0	5.0
5.0	-	24/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

treatment : mg/l leaves / petioles: % / % - : no shoot

표2.BAP, NAA, AgNO3 처리에 따른 N78 재분화율의 효과

BAP	NAA															
	0.5				1.0				1.5				2.0			
	AgNO3															
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
2.5	-	-	-	0/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0	-	0/5	-	0/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/5
7.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/5	-	-	5/5	-
10.0	-	-	5/0	5/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

treatment : mg/l leaves / petioles: % / % - : no shoot

표3. BAP, NAA, AgNO3 처리에 따른 N78 재분화율의 효과

BAP	NAA							
	0.5				1.0			
	AgNO3							
	0	1.0	2.0	3.0	0	1.0	2.0	3.0
5.0	10/0	-	10/0	-	-	15/0	5/0	5/0

treatment : mg/l leaves / petioles: % / % - : no shoot

나. 진주대평의 재분화

실험재료는 두 최사 품종인 진주대평 (경신종묘, 동부한농)를 가지고 수행하였으며 절편체 부위는 자엽과 하배축을 사용하였다. 먼저 선행된 N78 재분화 실험에서 15% 재분화율을 보였던 자료를 근거로 하여 BAP 5.0㎎/l , NAA 1.0㎎/l, AgNO3 1㎎/l 농도 조건에서 shoot양상을 보고자 하였다.. 재분화 배지에 치상한 지 40일경에 부분적으로 shooting이 이루어졌으며 결과적으로 낮은 것은 2-3% 높은 것은 7%정도로 나타나 경신종묘의 진주대평이 재분화효율이 더 좋음을 관찰하였다.(표4).

재현성이 낮은 무에 있어서 보다 안정적인 재분화율을 확립하고자 진주대평에 auxin인 NAA 와 cytokinin인 BAP를 농도별로 세분화하여 혼용처리한 후 shoot 분화를 조사하였다. 그 결과 자엽보다는 하배축에서의 재분화율이 안정적이고 높은 것으로 나타났으며. BAP 2.5 ㎎/l NAA 1.5 ㎎/l AgNO3 1.0㎎/l에서 자엽의 재분화율이 16.6%로 나타났으며 BAP 5.0 ㎎/l NAA 1.0 ㎎/l AgNO3 1.0㎎/l에서 하배축의 재분화율이 22.5%였다. 하지만 자엽과 하배축의 재분화에 있어서 두 절편체에 대해 고루 재분화율이 나타난 BAP 5.0 ㎎/l NAA 1.0 ㎎/l AgNO3 1.0㎎/l 처리구가 재분화의 배지로 선택하는 것이 안정적이라 판단되어진다(표5,그림1)

표4. BAP 5.0㎎/l, NAA 1.0㎎/l, AgNO3 1.0㎎/l농도 조건에서 이루어진 진주대평 재분화율

	explant type	explant NO.	shooting (%)
경신종묘 진주대평	자엽	110	8(7.3%)
	하배축	130	4(3.0%)
동부한농 진주대평	자엽	80	0(0%)
	하배축	120	2(1.6%)

표5. BAP, NAA ,AgNO3에 따른 진주대평의 재분화율

BAP	E	NAA															
		0.5				1.0				1.5				2.0			
		AgNO3															
		0	1.0	3.0	5.0	0	1.0	3.0	5.0	0	1.0	3.0	5.0	0	1.0	3.0	5.0
2.5	C	-	-	-	-	-	3.3	-	3.3	-	3.3	3.3	-	-	-	-	3.3
	H	-	2.5	-	7.5	5.0	2.5	7.5	2.5	-	22.5	10.0	7.5	-	-	7.5	12.5
5.0	C	-	-	3.3	3.3	-	6.6	-	-	-	-	6.6	-	-	16.6	3.3	3.3
	H	-	-	2.5	-	5.0	7.5	12.5	5.0	-	2.5	5.0	7.5	10.0	7.5	-	10.0

concentrations: mg/l E: explant C: cotyledon H: hypocotyl

- : no shooting shooting formation : %

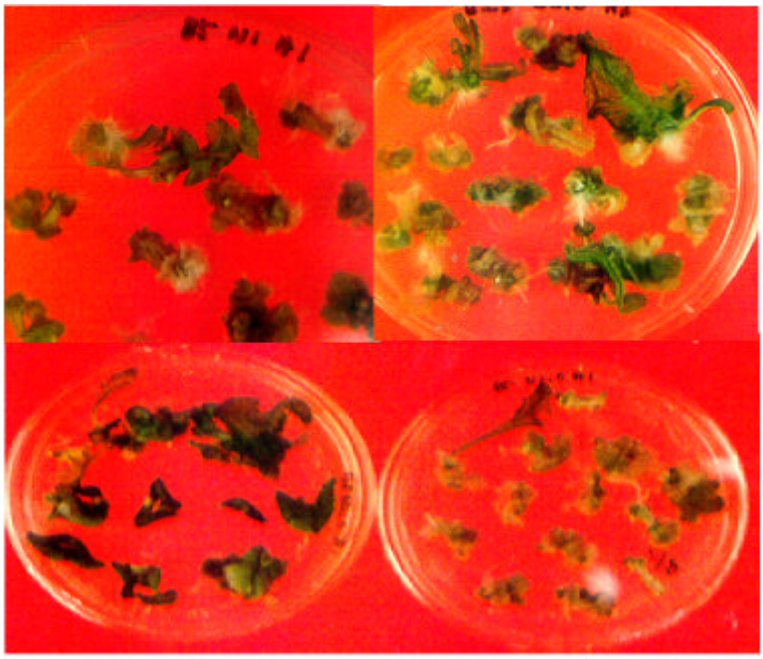


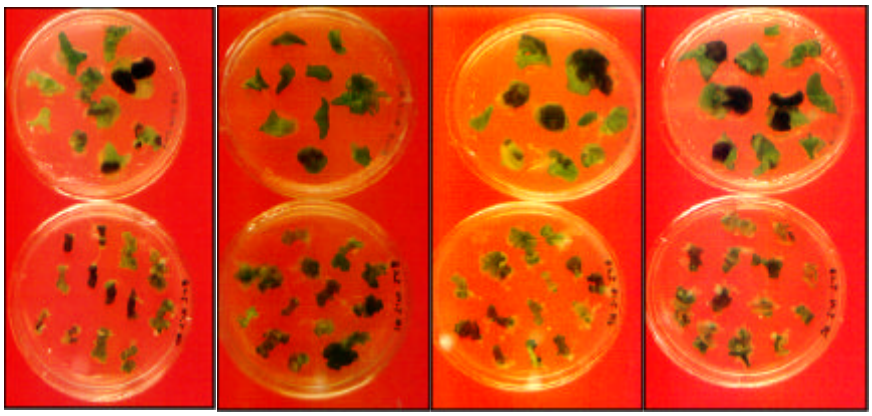
그림 1. 진주대평의 재분화 모습

다. NAA와 에틸렌 억제제 처리 효과

기내 배양시 무 절편체는 배지에 닿는 부분이 갈변하여 생장 억제 및 조직이 고사되는 현상을 많이 관찰할 수 있었다. 갈변현상은 조직이 상처를 받았을 때 산화조건에서 합성된 polyphenoloxidase, trosinase와 같은 구리를 포함하는 산화효소의 작용 때문이라고 알려져 있는데, 배지내 auxin 양이나 모식물체의 생육환경에도 영향을 받는다고 보고되었다. 갈변현상을 방지하기 위해서 절편체를 새로운 배지에 자주 옮겨주거나 phenol 산화효소의 활동을 억제하는 물질을 첨가하거나 또는 phenol를 흡착하는 활성탄 등을 처리하는 방법이 개발되어 있으나, 물질을 첨가하거나 배양도중 배지를 자주 바꾸어 주는 방법은 대량 배양시 매우 불편하다. 대량 배양시에도 불편함을 덜고 갈변현상이 최소로 나타나는 적절한 auxin 농도를 찾고자 NAA를 0.5 , 1.0, 1.5, 2.0 ㎎/l로 처리하였다. 가장 효율적인 농도는 NAA 1.0 ㎎/l임을 관찰할 수 있었다.

또한 에틸렌은 tryptophan이 내성 auxin인 IAA로 전환되는 과정에 관여하여 auxin의 양을 감소시키거나, 체내에서 생성된 auxin의 운반을 억제하는 작용을 하다고 보고된 것을 근거로 하여 본 실험에서도 에틸렌 억제제를 처리함으로써 기내 식물의 재분화 효율을 높여보고자 적정한 에틸렌 억제제인 AgNO3를 0 , 1.0, 3.0, 5.0 ㎎/l로 처리하였다. 따라서 갈변현상이 나타나지 않으면서 에틸렌 발생을 억제하는 적절한 조합을 찾고자 auxin과 에틸렌 억제제를 혼용처리하여 수행하였다.

처리한 결과 에틸렌 억제제의 고농도 사용은 오히려 갈변현상을 더욱 심화시켰으며, 가장 적절하다고 판단되어지는 조합은 NAA 1.0㎎/l , AgNO3 1.0㎎/l 이였다(그림 2). 이는 에틸렌 억제제를 처리함으로써 auxin과 관계된 에틸렌의 작용을 억제하여 무의 shoot를 분화에 효과적인 것으로 생각된다.



AgNO3 0 AgNO3 1.0 AgNO3 3.0 AgNO3 5.0

그림2. NAA 1.0mg/l 와 에틸렌억제제 AgNO3(mg/l) 혼용처리 효과

라. 뿌리유도 및 순화

절편체로부터 shooting된 개체는 MS기본배지(Murashige and Skoog medium, 2% sucrose, 0.8% Agar, pH 5.6-5.8)에 뿌리 유도를 돕기 위해 NAA 0.05 mg/l를 첨가한 배지로 옮겨 2주정도 배양한 후, 뿌리와 함께 순화시킨다. 순화를 시킬때는 발근제를 처리하여 연약한 기내식물체가 건실하게 pot에 뿌리 내릴 수 있도록 해준다.

제 3절 형질전환 체계 확립

1.도입유전자

포항공대에서 분양 받은 무 형질전환용 유전자인 GIGANTEA (GI)와 CONSTANS (CO)-RsCO를 이용하였다. GI의 vector는 pCAMBIA 3301 이며 CO의 vector는 pGA 748을 이용하였다. 주로 RsCO 유전자를 사용하여 실험을 수행하였다. 두가지 모두 NPTII유전자를 포함하고 있어 후에 분자생물학적 방법에 있어서 선발표지역할을 한다.

2. *agrobacterium tumefaciens*를 위한 배양 조건

항생제가 포함된 plate에서 단일 colony를 취하여 YEP(Peptone 10g/l , Yeast extract 10g/l, NaCl 5g/l, pH 7.0)배지 10ml에 각각 항생제를 첨가한 후 colony를 접종하고, 이것을 28℃ shaking incubator에서 200rpm의 속도로 overnight 배양하였다.

가.pCAMBIA 3301 vector : 50mg/l kanamycin

나.pGA vector : 25mg/l kanamycin

3. 항생제내성실험

형질전환시 외부 유전자가 삽입된 형질전환체만을 선발해 내기 위한 표지로서 kanamycin에 내성을 나타내는 NPTII gene이 널리 사용된다 . 그러나 식물체 종류와 부위에 따라 항생제에 내성이 달리 나타날 수 있으므로 그에 따른 적정한 kanamycin농도

를 결정하여 사용해야 한다. 적정한 농도를 결정하고자 kanamycin 0 ㎎/l , 5㎎/l , 10㎎/l , 20 ㎎/l , 30 ㎎/l , 40 ㎎/l , 50㎎/l를 각각 첨가하여 항생제 내성 정도를 조사하였다. 배지에 치상한후 4주후에 조사한 결과 처리하지 않은 처리구에선 100% callus 형성율을 보였으며 점차 농도가 높아질수록 callus 형성과 shoot 분화율이 현격하게 떨어지고, 식물체가 황화되고 점점 백화되어 죽어가는 것을 관찰할 수 있었다. 항생제의 농도는 kanamycin 5㎎/l , 10㎎/l , 20㎎/l에서 callus 형성과 shoot분화가 이루어졌으나(결과생략) 무는 재분화율이 현저히 저조한 것을 감안하여 항생제 농도를 5㎎/l에서 선발하였다.

4. 형질전환과정

진주대평의 형질전환은 식물체의 형질전환방법 중에서 매우 안정적으로 외부 유전자를 식물체 염색체내로 삽입할 수 있다고 보고된 agrobacterium을 이용하는 방법을 이용하였으며, 증식된 agrobacterium을 진주대평의 절편체(자엽,하배축,본엽,엽병)와 공동배양하는 방법으로 이루어졌다.

형질전환 최적조건을 구명하고자 본 연구실의 경험을 토대로 절편체의 전처리(pre-culture), 배지와의 공동배양(co-culture) 및 acetosyringone의 첨가, 형질전환체 선발(selection)단계를 수행하였다.

가. 전처리 (pre-culture)

1㎝로 자른 절편체를 옆맥부위에 메스로 상처를 내어 MS 3% (Murashige and Skoog medium, 3% sucrose, pH 5.6-5.8)액체배지에 침지하는 방법과 MS2%(Murashige and Skoog medium, 2% sucrose, 0.8% Agar, pH 5.6-5.8)고체배지에서 치상하는 방법으로 수행하였다. 이는 *agrobacterium*에 접종시 식물절편체의 손상을 완화시켜주기 위한 처리과정으로 하루동안 배양하였다.

나. 공동배양 (co- culture)

전처리한 절편체를 1시간내지 3시간정도 *agrobacterium*과 공동배양을 하였다. 이때 암상태로 두어 배양하였으며 온도는 28℃에서 접종시켰다. 접종시킬때는 phenolic

compounds인 acetosyringone에 의해 vir gene의 발현이 유도되어 *agrobacterium*의 T-DNA를 식물세포내로 전이 유도하는데 중요하게 작용한다는 것이 밝혀졌다. 또한 *Arabidopsis thaliana*의 형질전환시 acetosyringone첨가에 의해 형질전환율이 2-3%에서 55-63%로 증가하였다고 보고되고 있다. 본 실험에서도 형질전환율을 높이고자 공동배양시 acetosyrigone 20㎎/l를 함께 첨가하여 공동배양시켰다. 그후 filter paper위에 놓고 1시간내지 5시간정도 건조시켜준다.

다. 선발(selection)배지에서의 배양

초기 실험에서는 무의 재분화율이 다른 작물에 비하여 현저하게 낮기 때문에 항생제 처리 없는 선발배지에 치상하여 수행하였으며 선발배지에는 절편체 표면에 접종된 *agrobacterium* cells을 제거하기 위하여 cefotaxime 250㎎/l을 첨가하고, 재분화실험에 의해 결정된 재분화배지 호르몬 조합인 BAP 5.0㎎/l, NAA 1.0 ㎎/l, AgNC3 1.0㎎/l를 첨가하였다. 4주마다 동일한 배지로 계대배양을 하면서 형질전환체라고 판단되는 것들을 선발하였다.

또한 계속적인 형질전환 실험을 수행하면서 보다 많은 형질전환체를 얻기위해 선발배지 조건을 다음(표6)과 같이 수정하였으며 선발단계로써 재역할을 하기위해 항생제내성 실험을 통하여 결정된 kanamycin 5㎎/l를 선발배지에 첨가한 배지에서 형질전환체를 선발하였다.

cotyledon selection medium	hypocotyl seleton medium
BAP 5.0mg/l NAA 2.0 mg/l AgNO3 1.0 mg/l cefotaxime 250mg/l kanamycin 5.0mg/l	BAP 2.5mg/l NAA 1.5 mg/l AgNO3 1.0mg/l cefotaxime 250mg/l kanamycin 5.0 mg/l

5. 형질전환체 획득(TO 세대)

형질전환 시켜본 결과 자엽은 BAP 10.0 ㎎/l NAA 1.0 ㎎/l에서 신초가 생성되었으며 하배축에서는 BAP 5.0 ㎎/l NAA 1.0 ㎎/l에서 신초가 생성됨을 볼 수 있었다.본엽과 엽병에서 신초가 생성되는 것이 관찰되지 않았다(표7). 특이하게도 자엽으로부터 생성된

신초는 계대배양하는 과정에서 계속 증식하여 여러 개체를 얻을 수 있었다. 이것은 줄기분화 된 부위를 분리해서 옮길 때 식물체 하부에서 생성된 callus의 영향인 것으로 보인다. 3번 정도 계대배양 후에는 증식되는 개체수가 없었는데 이것은 형질전환 시에 식물체가 훗수한 호르몬이 3달 정도 까지는 그 영향을 미치는 것으로 보여진다. 그 후 뿌리를 유도하기 위해서 carbenicillin 500㎎/l, NAA 0.05㎎/l 첨가된 배지에서 배양 후 식물체의 성장상태에 따라 순화과정으로 들어갔다(그림3).

표6.형질전환실험결과 (GI 유전자도입)

호르몬 조합	explant type	explant no.	shooting	medium type
BAP 5.0㎎/l NAA 1.0㎎/l	자엽	50	0	고체배지 (MS 2%)
	하배축	50	0	
BAP 5.0㎎/l NAA 1.0㎎/l	자엽	50	0	액체배지 (MS 3%)
	하배축	50	0	
BAP 10.0㎎/l NAA 1.0㎎/l	자엽	40	0	액체배지 (MS 3%)
	하배축	40	0	

표 7. 형질전환실험 결과 (RsCO유전자도입)

호르몬 조합	explant type	explant no.	shooting	medium type
BAP 5.0mg/l NAA 1.0mg/l	자엽	60	0	고체배지 (MS 2%)
	하배축	70	7	
	본엽	31	0	
	엽병	81	0	
BAP 5.0mg/l NAA 1.0mg/l	자엽。	40	1	액체배지 (MS 3%)
	하배축。	65	0	
BAP 10.0mg/l NAA 1.0mg/l	자엽。	45	1	액체배지 (MS 3%)
	하배축。	60	2	
	본엽	70	0	
	엽병	73	0	

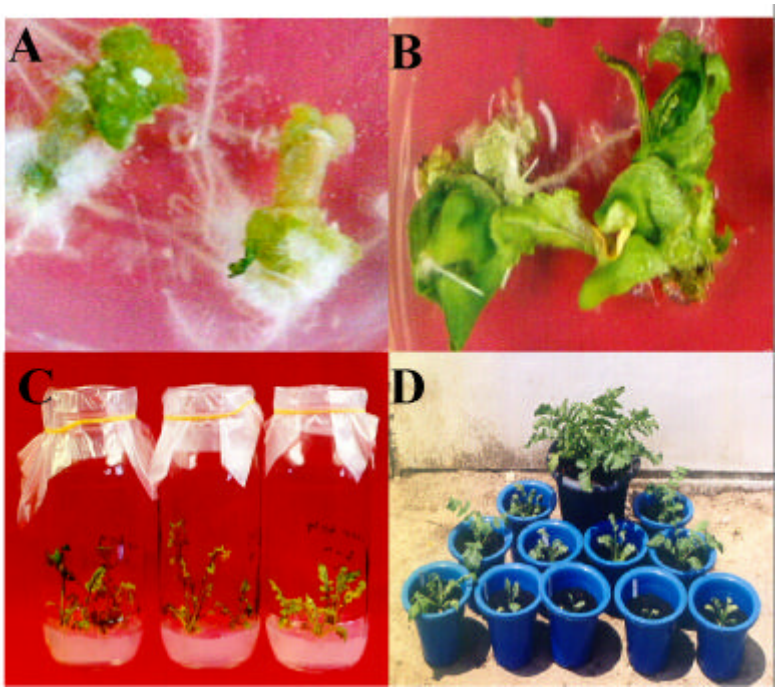
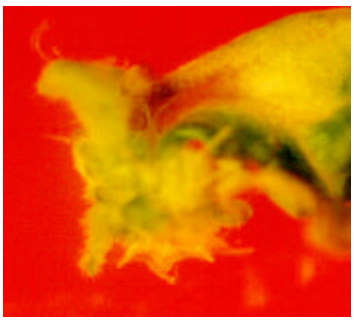


그림3. 형질전환체 줄기신장과 발달과정

A:선발배지에서의 shoot 분화(하배축) B:선발배지에서의 shoot 분화(자엽)

C:형질전환체식물 뿌리유도 D:순화된 형질전환체 식물



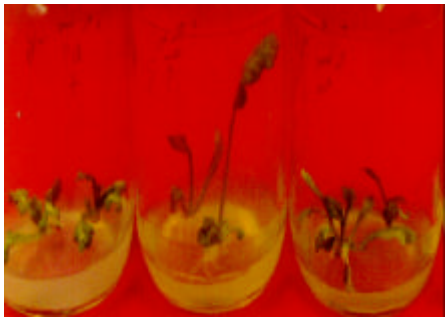


그림 4.shooting 된 형질전환체

A. shooting 분화　　B. 형질전환체의 뿌리유도

제 4 절 형질전환체 분석(T0세대)

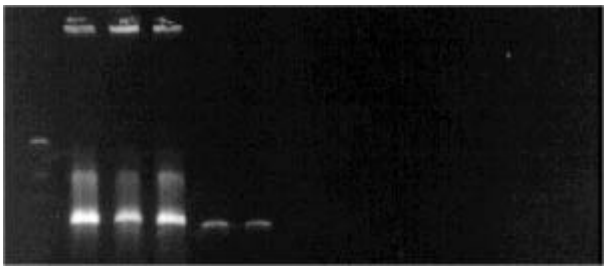
형질전환한 후 얻은 개체들은 순화하는 과정에서 두 개체만이 계속하여 포장에서 종자(T1세대)를 얻게 되었다. 자엽에서 유래한 개체에서는 기내에서 순화하는 과정에 있어서 증식을 하여 여러 개체를 얻을 수 있었다. PCR, Northern blot을 이용하여 Agrobacterium의 T-DNA가 식물체내에 삽입되었는지의 여부를 확인하였다.

1. PCR

CTAB 방법을 이용하여 genomic DNA를 추출하였으며, Total DNA는 0.7% 아가로오스 겔(agarose gel)에 전기영동하여 DNA양을 확인한다. 10ng/2㎕의 DNA, 40pM/2㎕ primers, Dynazme I unit, 10X buffer 2㎕, 증류수 11㎕을 총 20㎕로 섞은 다음, 25㎕ 미네랄 오일을 첨가 하였다. 선발표지유전자인 kanamycin 항생제 저항성 유전자(NPTⅡ) primer를 이용하여 94℃에서 1분간, 55℃에서 1분, 72℃에서 1분 30초의 조건으로 35 사이클(cycle)을 실시한 후 마지막으로 72℃에서 10분간 post-elongation을 시킨다. 그리고 증폭된 DNA는 0.8% 아가로오스 겔로 전기영동하여 밴드(band)를 확인한다.

개화조절유전자(RsCC)를 가지고 형질전환을 수행하여 획득된 형질전환 T0세대 식물체들을 가지고 그 유전자가 식물체내로 도입되었는지의 여부를 NPT Ⅱ gene specific primer를 이용하여 PCR분석을 수행하였다. pimer의 specific band length는 약 700bp이며 그 nucleotide sequence는 5‘-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3' , 5'-ATGGGGAGCGGCGATACCGTA-3' 이다. 수행한 결과 NPTⅡ gene에 해당하는 700bp의 band가 확인됨으로서 형질전환체 식물들내로 개화조절유전자(RsCC)가 성공적으로 도입되었음을 확인하였다. (그림 4)

A. M P P P 1 2 3 4 5 6 7 8 N



P1,P2,P3 : Positive control, N: Negative control,

1-8 line : putatively transgenic plants

B. m p 1 2 3 4 5 6 7 8 w a b c d e

m:marker p:positive w: control

1-8: putative transgenic plants (T0 regeneration)

그림5.T0세대의 PCR 분석결과

2. Northern blot

이후 PCR검정으로 확인된 식물체를 이용하여 Northern blot를 실시한 결과, 총 9개체 중 4개체에서 확인할 수 있었다. Northern blot를 실시해서 형질전환되었다고 생각되어지는 4개체는 기내에서 순화과정을 거쳐 포장으로 옮긴 후에 대조구(형질전환하지 않은 식물체)와의 포장검정을 실시하였다. Kanamycin 항생제 저항성 유전자(NPT Ⅱ)를 프로브(probe)로 한 형질전환 식물체의 Northern hybridization 분석을 실시한 결과, 유전자의 안정적인 식물체 내로의 도입을 확인할 수 있었다.

1 2 3 4 5 6 7 8

표8. 형질전환개체 및 검정

호르몬 조합	gene	개체수/확인수	비고
BAP 5.0 NAA 1.0 AgNO3 1.0	RsCO (하배축에서 유래)	1/1	대조구보다 30일정도 늦게 추대 Northern hybridization T1 PCR 검정
BAP 10.0 NAA 1.0	RsCO (자엽에서 유래)	8/3 8 2	대조구보다 30일정도 늦게 추대 Northern hybridization 순화후 포장** 기내에서 순화중

3. 추대경향 및 개화비교

포장에서 control plant는 종자상태로 파종을 하고 putative transgenic plant는 기내에서 순화후에 유묘상태로 순화과정을 거쳐 비교했음에도 불구하고 control plant는 파종후 30-65일정도에 추대가 나타나고 northern blot으로 확인된 transgenic plant들은 68일-70일정도에 추대현상 나타났다.(그림6,7) 그이후 계속적으로 생산된 형질전환체 식물들 또한 control plant보다 2-3일 후에 추대현상이 나타남을 관찰하였다.(그림 8)

그림6. control plant 와 putative transgenic plant 추대경향 비교

그림 7. control plant 와 putative transgenic plant 개화비교

그림 8. 여러 T0 세대의 추대 경향

제 5절 후대 검정 (T1 / T2 세대)

조사결과 / 조사형질	표현형	개체수/조사수	분리비	Dominance	χ2	P value	모계형질	
							진주대평	시무
Root color	Green	119/172	3	dominant	3.10	0.05< P< 0.08	Green	White
	White	53/172	1	recessive				
Leaf color	wide	131/166	3	dominant	1.36	0.20< P< 0.30	Wide	Narrow
	Narrow	35/166	1	recessive				
petal color	Purple	47/164	1	codominant	4.83	0.08< P< 0.20	Purple	White
	Mordera te	68/164	2	semidomina nt				
	White	49/164	1	codominant				

1. T1 세대

형질전환 식물체(T0)를 자가 수정을 시켜서 얻은 종자들을 이용해서 T1세대 식물체들을 성장시켰다(그림9). 계속해서 획득한 다른 T0세대 식물체로부터 얻은 T1식물체를 생육하여 추대경향과 그 다음 세대의 종자확보를 위해 재배하고 있다. (그림10)

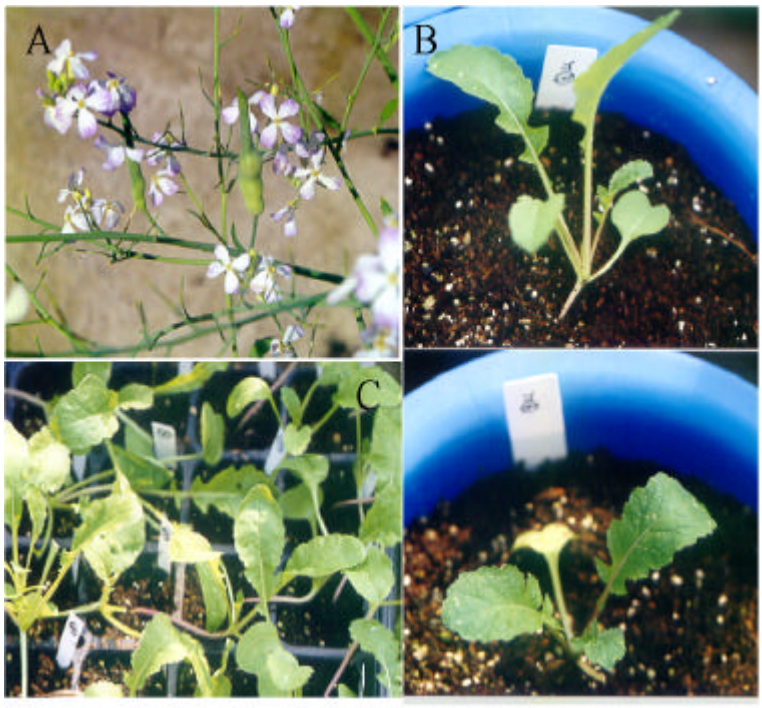


그림9. T0세대에서의 종자결실(A) 및 T1 세대 생육모습(B,C)

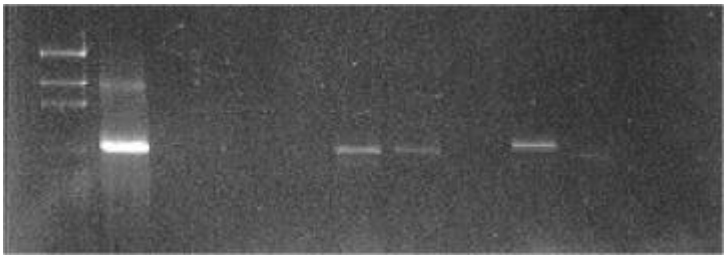
그림10. T1 세대 식물체 모습

Northern hybridization에서 확인된 개체에서 얻은 seed를 파종하여 PCR 예비실험을 한 결과(그림11. A) 무작위로 선택한 12 개체 중에서 8 개에서 확인함으로써 유전자가 안정적으로 후대로 유전되었음을 확인할 수 있었다. 그 후 종자를 파종하여 무작위적으로 40개체중에서 12개체를 선정하여 NPTII primer를 이용하여 PCR 검정을 하였다(그림 11.B). PCR검정을 실시한 결과는 다음과 같다.

그림 11. T1세대 PCR 분석

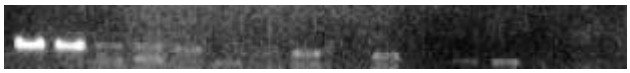
A. T1세대 예비실험 결과

M P 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



B. T1세대 PCR 분석 결과

P P 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 N



T1 세대 38개체의 유묘를 조명실에 두어 추대경향을 살펴보았다. 조건은 5000-6000 lux,수은등 나트륨등으로 24hr조명,온도 25℃ ± 2에서 비교했으며 조명조건에서 수행하였기 때문에 자연조건보다 추대차이가 작게 나타났다. (그림 12, 표 9)

그림12. T1세대 개화 모습

표 9. T1세대 개화시기 비교 (첫 꽃이 개화되는 시기를 기준)

조 합 명 (계 통 명)	개 화	조 합 명 (계 통 명)	개 화
T1 RSCO 1	1.26	T1 RSCC22	1.26
2	1.26	23	1.26
3	1.26	24	1.26
4	1.27	25	1.26
5	1.26	26	1.26
6	1.26	27	1.26
7	1.26	28	1.26
8	1.26	30	1.26
9	1.26	31	1.26
10	1.26	32	1.26
12	1.26	33	1.26
13	1.26	34	1.26
14	1.26	35	1.26
15	1.26	36	1.26
16	1.28	37	1.28
17	1.26	38	1.26
18	1.26	39	1.27
19	1.27	40	1.26
20	1.27	CONTRCL 1	1.26
21	1.26	2	1.26

2. T2세대

T1세대 식물체들은 PCR 검정을 한 후 중앙종묘에 도움을 받아 T1세대의 추대경향를 살펴보고 T2세대 종자을 얻었다. T2세대 종자를 line당 4립을 파종하여 T2 세대 유묘들을 PCR 검정을 실시하였다. 무작위적으로 각각 38 line에서 40개체를 선택한 후 NPT II gene specific primer를 이용하여 PCR분석을 수행하였으며, 수행한 결과 T2세대에도 700bp에 밴드를 확인함으로써 개화조절유전자인 RsCO gene이 도입됨을 확인하였다.(그림12,13)

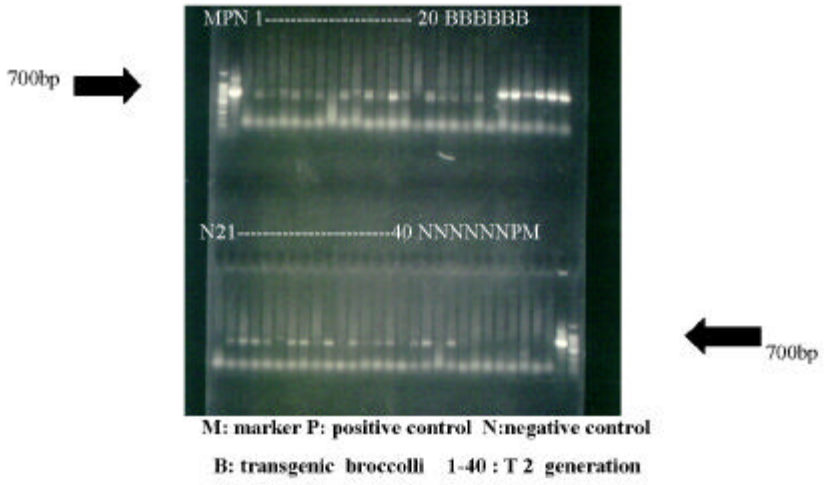


그림12. T2 세대 PCR 결과

제 6절 적 요

기존의 본 연구실의 경험을 토대로 본 연구에서는 무의 재분화 조건과 *Agrobacterium*에 의한 형질전환 체계을 확립하므로서 무의 잡종세대로의 만추대성 개화 조절유전자를 도입 및 발현을 확인하고자 수행되었다. 공시재료는 추대에 민감한 진주대평 종자를 사용하였으며, 배양절편체는 자엽과 하배축,본엽과 엽병을 이용하여 수행하였다. 재분화 기본배지의 조성은 MS배지 , 2% sucrose, 0.8% agar였다. 생장조절제로는 BAP, NAA를 농도별로 사용하였으며 에틸렌 억제제인 AgNO3 를 함께 처리하여 그 효과를 비교하였다. BAP 5.0㎎/l, NAA 0.5 - 1.0㎎/l 에서 부분적으로 줄기분화가 일어났으며 에틸렌 억제제인 AgNO3 1.0 ㎎/l 를 처리한 배지에서 재분화가 이루어졌다. 재분화 실험을 바탕으로 형질전환은 전처리를 거친후 RsCO 유전자와 NPTII가 도입된 *Agrobacterium*를 이용하여 공동배양한 후 선발 배지에 치상하였다. 선발배지에서 재분화가 되어진 식물체들을 NPT II primer를 이용한 PCR 검정에서 putatively transgenic plants를 확인할 수 있었으며 그 후 NPTII 유전자 probe로 한 형질전환 식물체의 Northern hybridization 분석에서 유전자의 안정적인 발현을 확인할 수 있는 positive bands를 관찰되었다. 또한 T0세대로부터 T1세대 식물체를 PCR검정한 결과, 무작위로 선택한 12 개체 중에서 8 개에서 확인되어서 유전자가 안정적으로 다음세대로 유전이 되고 있음이 확인되었다. 추대경향은 T0 세대 식물체는 대조구보다 30일 정도 추대가 늦음이 관찰되었고, T1 세대 중에서 38개체의 유묘를 조명실에 두어 추대경향을 비교한 결과 1- 2일정도 차이가 있었으며 이는 조명조건이기에 자연상태보다 차이가 적게 나타난 것으로 생각된다. T2세대 식물체에서도 NPT II primer를 이용하여 PCR분석을 수행한 결과 700bp 밴드를 확인함으로써 개화조절유전자인 RsCO gene이 계속해서 다음세대로 유전되고 있음을 확인하였다.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림특정 연구사업의 연구보고서 입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림특정연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

고품질 만추대성 무 품종 개발