

GOVP1200102164

633.085

L 293 乙

최 종  
연구보고서

## 채소 종묘의 순도 향상을 위한 생명공학적인 기술 개발

Development of Biotechnological Techniques for the  
Improvement of Seed Purity of Vegetable Crops

연구기관  
서울대학교

농 립 부



## 최 종 보 고 서

1995 년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 채소 종묘의 순도 향상을 위한 생명 공학적 기술 개발에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부

2. 최종보고서 CD-ROM 1매

2001 . 1 . .

주관연구기관 : 서울대학교

총괄연구책임자 : 박 효 근 (인)

주관연구기관장 : 이 기 준 직인

**농림부장관 귀하**

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “채소 종묘의 순도 향상을 위한 생명 공학적 기술 개발” 과제 (세부과제 “제초제 저항성 유전자와 분자표지를 이용한 가지과 작물의 종묘 순도 향상법 개발“, “제초제 저항성 유전자를 이용한 십자화과 작물의 종묘 순도 향상법 개발“, “형질전환 계통 육성 및 제초제 저항성 일대잡종의 실용화“, “제초제 저항성 유전자와 분자표지를 이용한 박과 작물의 종묘 순도 향상법 개발“)의 최종보고서로 제출합니다.

2001 . 1 . .

주관연구기관명 : 서울대학교  
총괄연구책임자 : 박 효 근  
협동연구기관명 : 강원대학교  
협동연구책임자 : 송 용 남  
협동연구기관명 : 중앙종묘  
협동연구책임자 : 이 철 우  
위탁연구기관명 : 생명공학연구소  
위탁연구책임자 : 유 장 렬

# 요 약 문

## I. 제 목

채소 종묘의 순도 향상을 위한 생명공학기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

본 연구는 국내의 중요한 몇몇 채소 작물에 있어서, 간편하고 정확한 순도 검정을 실시함과 동시에 종묘의 순도를 적극적으로 향상시킬 수 있는 방법을 개발하는 데 목적을 두고 있다.

구체적으로 본 연구는 형질전환 방법을 통하여 제초제 저항성 유전자를 육종 소재로서 상용되는 중요한 계통으로 도입하는 전략으로서 유묘단계에서 제초제를 살포함으로써 순도검정과 순도향상을 간편하게 달성할 수 있는 큰 장점이 있다. 즉, 제초제 저항성 유전자가 형질전환된 계통의 후대는 제초제를 처리하였을 때 살아남지만, 이 종자들과 섞여 있는 혼입 종묘는 제초제로 인하여 고사하게 된다. 따라서, 한 계통의 종자군 안에, 혼입 종자의 양이 얼마나 되는지 알 수 있음과 동시에 그 계통의 진정한 후대들을 선별해낼 수 있게 된다. 이러한 원리는 일대 교잡 종자의 채종 단계에서도 적용된다. 형질전환된 계통을 화분친으로 이용하면 모친의 자가수분 종자나 다른 화분의 유입에 의해 발생한 혼입 종자를 제초제 살포시 생존여부로 구분해 낼 수 있게 된다. 따라서, 제초제 저항성 유전자가 도입된 계통을 일대 교잡종의 채종에 이용하면 일단계로 채종포에서 제초제를 살포하여 교잡 대상이 아닌 이형주를 제거할 수 있으며, 또한 이들로부터 생산된 일대교잡 종묘에 있어서도 제초제를 이용하여 혼입 종묘를 제거하고 진정한 일대교잡 종묘를 얻을 수 있다. 따라서, 궁극적으로 종묘의 순도 향상을 달성할 수 있다.

RAPD 마커를 이용한 종묘 순도 검정법의 개발도 동일한 목적으로 수행되었다. 현재 사용되는 대부분의 종묘 순도 검정법은 구별이 가능한

형질이 나타날 때까지 대상개체들을 재배하여 육안으로 직접 검정하는 방법들이다. 이는 정확도에 있어서는 가장 좋은 방법이지만, 식물체를 재배하는 데 드는 시간과 인력, 비용이 중요 회사에 큰 부담이 되고 있으며, 결과적으로 중요생산비의 증가분이 농민들의 부담으로 돌아가고 있다. 따라서, RAPD 마커를 이용하여 종자나 자엽 단계에서 정확하게 이형주를 가려냄으로써 검정 대상체를 키우는 데 소요되는 시간과 자원을 줄일 수 있도록 하고, 아울러 RAPD 마커를 이용하는 과정에서의 비용 절감과 소요시간의 단축을 통해 민간 중요회사에서 부담 없이 이용할 수 있을 정도의 실용적인 RAPD 마커 이용 검정 체계를 세우는 것이 이 과제의 최종목적이다.

우리 농업은 WTO 출범과 IMF 관리 체제라는 질곡을 거쳐 국제 시장에서의 경쟁이라는 격전장 앞에 서 있다. 특히 우리 중요 산업은 그 선두에서 거대한 국제 중요 기업들과 경쟁하여야 하는 상황이며, 우수한 품종의 개발과 종자 품질의 향상, 확실한 홍보와 영업을 통해 활로를 모색해야 한다.

국내 중요업계는 그동안 우수품종의 개발에 노력해 왔고, 그 결과 몇몇 품종은 선진국과 어깨를 견주는 수준이 되어 수출도 꾸준히 늘어왔다. 그러나, 종자의 품질 면에 있어서는 아직까지 개선해야 할 부분이 많은데, 그러한 부분 중의 하나가 종자의 순도이다.

현재 우리 중요업계의 주력 품종들은 대부분 일대교잡종이다. 이들은 생산과정에서, 경제적 채종을 위해 이용되는 자가불화합성이나 응성불임의 불완전성, 인공교배자의 실수 및 채종포 관리자의 철저하지 못한 포장관리 등으로 인해 순수한 일대 교잡종자가 아닌 모계, 부계 또는 타 화분에 의한 종자 등이 혼입되는 경우가 많고, 이것이 종묘의 순도를 떨어뜨리는 원인이 된다. 특히 채종과정의 비용절감을 위해 1991년부터 시작된 해외 채종이 그동안 급격히 증가하여 현재 소요량의 대부분을 해외에서 채종하고 있다. 그런데, 해외에서 채종한 종자는 채종 과정에서의 관리 수준이 국내에서 채종할 때보다 떨어지기 때문에 순도가 더욱 불량하며, 따라서 각종 종자 사고의 원인 중의 하나가 되고 있다.

그러므로, 종자사고에 따른 농민들의 피해와 분쟁의 소지를 미연에 방지하고 우리 중요산업의 국제 경쟁력 확보 및 세계 시장 진출을 위해서는 종묘의 순도 향상과 실용적인 순도 검정법의 개발로서 제기되는 문제를 해결해야 하며, 본 연구의 중요성은 여기서 찾을 수 있다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 제초제 저항성 유전자의 형질전환

제초제 저항성 유전자는 가장 널리 이용되는 *bar* 유전자를 사용하였다. 제초제 저항성 유전자를 형질전환할 대상 작물로는 국내에서 중요하게 재배되는 작물로, 가지과 작물인 고추, 십자화과 작물인 배추, 브로콜리, 치커리, 박과 작물인 오이와 수박을 대상으로 선택하였다. 식물재료는 본 연구의 결과가 최단기간 내에 실용화될 수 있도록 중앙종묘사의 육종 소재를 분양받아 사용하였다.

고추의 경우 일대교잡 종자의 채종과정에서 응성불임을 이용하므로 타 화분에 의한 오염수분이나 자가수분 종자로부터 진정 일대교잡종자를 선별해 내기 위해 일대교잡종의 화분친을 위주로 형질전환을 수행하였고, 십자화과 작물의 경우에는 일대교잡 종자의 생산에 자가불화합성을 이용하므로 이들 계통에 형질전환을 수행하였다. 박과 작물은 인공교배로 채종하므로 고추와 같이 화분친에 제초제 저항성을 도입하여 진정 일대교잡종자를 선별해낼 수 있도록 하였다.

작물별로 적합한 재분화체계를 세우고 형질전환체계를 확립하였다. 형질전환 개체에 대해서는 PCR 분석, genomic southern blot analysis, RT-PCR, northern blot analysis 등의 분자 수준에서의 검정 방법을 이용하여 형질전환 여부를 확인하였고, 이들에 대해 제초제를 직접 처리하는 생물검정도 진행하였다.

형질전환 개체는 자가수분과 인공교잡을 통해 후대의 종자를 채종하였으며, 이들 후대에 대해서도 생물검정과 분자적 검정을 병행하여 제초제

저항성 유전자가 도입된 후대를 선발하였다.

이렇게 선발된 제초제 저항성 형질전환 후대를 비형질전환체와 섞어 제초제 저항성 검정을 수행하였으며, 이를 통해 순도 검정에의 이용 가능성을 타진하였다.

## 2. RAPD를 이용한 실용적인 순도 검정 방법의 개발

RAPD를 이용한 실용적인 순도 검정 방법을 개발하기 위해서 고추를 모형으로 UBC random primer를 이용하여 계통 특이적인 RAPD 마커를 개발하였다. 이 마커는 염기서열 결정과 specific primer의 제작을 통해 STS 마커로 전환되었다. 이것을 육종현장에서 실용적으로 사용할 수 있도록, DNA 추출을 간편하게 할 수 있는 방법을 개발하고, 전기영동과정을 생략하고 PCR 산물을 간편히 확인하는 방법을 개발하였다.

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구에서는 우선 고추와 브로콜리, 케일, 배추, 오이, 수박 등 모든 대상작물에 대해 재분화 체계 및 형질전환 체계를 확립하였다.

고추의 경우 형질전환에 필수적인 재분화 체계를 여러 방향으로 동시에 접근하여 자염을 절편체로 이용한 기관분화를 통해 효율적인 재분화에 성공하였다. 이것을 기본으로 형질전환 체계를 구성하였고, '가락김장 2호'의 회복친에 대해 제초제 저항성 유전자 *bar*의 형질전환을 수행하였으며, 약 150 개체의 T<sub>0</sub> 식물체를 얻었다. 여기서 약 5000개체의 T<sub>1</sub> 종자를 얻었으며, 생물검정을 통해 약 150 개체를 선발했으며, 이로부터 T<sub>2</sub> 세대를 전개하였다. T<sub>1</sub> 세대에 대한 제초제 처리 결과 비형질전환체와 형질전환체 후대 간의 뚜렷한 차이를 발견할 수 있었다.

십자화과 작물 중 배추, 브로콜리, 케일, 양배추에 대해 재분화 체계와 형질전환 체계를 확립하였고, 형질전환체를 얻어 후대를 전개하였다. 브로콜리의 경우 T<sub>3</sub> 세대까지 진전되었으며, 제초제 살포 결과 일반 살포 농도의 3배의 농도에서도 해를 입지 않는 결과를 보였다. 케일과 배추, 양배



추에 대해서도 다수의 형질전환체를 얻었으며, 이들도 고농도의 제초제를 살포하였을 때 생존하였다.

오이는 체세포배발생을 이용한 재분화 체계를 확립하고 이에 기반한 형질전환을 수행하여 제초제 저항성 유전자가 형질전환된 클론을 획득하였으며, 이들은 생물검정에서도 저항성을 나타내었다. 수박은 기관분화를 이용한 재분화 체계와 형질전환 체계를 확립하였고, 저항성 유전자가 형질전환된 개체를 얻어 T<sub>1</sub> 세대의 식물체를 얻을 수 있었으며, 이들에서도 제초제 저항성 유전자가 도입되었음을 확인하였다.

RAPD를 통해 대명 모계 특이 밴드 2개와 대명 부계 특이 밴드 1개, 광복 부계 특이 밴드 2개를 개발하였고, 대명의 모계 특이 밴드와 부계 특이 밴드에 대해서는 염기서열의 결정을 통해 STS marker로 전환하였다. NaOH를 이용한 DNA 추출법을 이용해 DNA 추출과정을 간략히 하였으며, 전기영동 과정 없이 tube, multiwell 등에서 직접 PCR 산물을 확인할 수 있도록 하였다. 대명 모계와 대명 부계에 대한 실제 순도 검정에 응용하여 본 결과 이 체계는 대명 모계에 대해서는 100% 정확도를 보였고, 대명 부계에 대해서는 전기영동과정을 수반하였을 때 역시 100%의 정확도를 보였다.

본 연구에서 개발한 각 작물의 재분화 체계와 형질전환 체계는 매우 유용한 기술로서 국내외 다른 연구팀들이 유사한 연구를 수행한다면 동일 작물의 경우 직접 사용이 가능하며 타작물에서의 응용가능성도 높다고 판단된다. 제초제 저항성 유전자 형질전환체를 이용한 순도 검정과 진정 종묘의 선별을 통한 순도 향상은 브로콜리에서 보는 바와 같이 그 적용 가능성이 매우 높다고 볼 수 있으며, 이것은 중앙종묘사에 의해 곧 실용화될 것이다. RAPD 마커를 이용한 종묘 순도 검정 체계도 약간의 생명공학 연구 시설만 갖추어진다면 언제라도 보급이 가능한 기술로서 종묘의 순도 검정 및 순도 향상에 큰 도움을 줄 수 있는 수준이다.

따라서, 본 연구의 결과물은 특허 출원과 동시에 종묘회사에 보급하여 우리 종묘업계의 국제 경쟁력을 높이는 데 도움이 되어야 할 것이다.

# SUMMARY

## I . Title

Development of Biotechnological Techniques for the Improvement of Seed Purity in Vegetable Crops

## II . Purposes and Importance of Study

This study has been conducted to develop a totally new way of not only testing but also improving the purity of F<sub>1</sub> hybrid seeds of several vegetables, which are important in Korea.

Our basic concept is that roguing of off-types could be done simply by spraying herbicide such as basta in F<sub>1</sub> nurseries if we can successfully transform a herbicide resistant gene (such as *bar*) into one of parental lines. When the herbicide will be sprayed on F<sub>1</sub> seedlings, only the true type, which should carry the herbicide resistant genes, would be survived, and off-type seedlings, which do carry the resistant gene, will dye. This will be very economical way to rogue off-types, resulting in pure standing.

We intend to transfer the resistant gene into only parental inbreds not to maternal ones, so we will be easily able to rogue not only selfed ones of maternal inbred but also ones which might be produced by contaminated pollination. This totally new method can be used as a method of detecting purity of F<sub>1</sub> seeds, but also it actually dramatically improve purity of F<sub>1</sub> seeds by roguing out the off-types in early nursery stage.

In addition to development of new roguing method using

transformation of herbicide resistant gene, we also develop a practical purity test system by using RAPD.

The most common ways to test purity of  $F_1$  hybrids seeds at present in Korea is the growing-out test in either greenhouse or field, which could be most accurate method. But, it costs high and takes long. Some seed companies are using modern techniques such as electrophoresis or molecular markers. But, all of these methods are simply able to check the degree of purity of  $F_1$  hybrids seeds, not possible to improve purity of  $F_1$  hybrids seeds. In contrast to the limit of the traditional purity test methods, our method to be developed will be able not only to check degree of purity as other traditional methods have done but also able to actually improve the purity of  $F_1$  hybrids seeds by roguing off the off-types in farmers' nursery.

Some vegetable seed companies in Korea have been fairly successful in developing excellent varieties, which have good competitiveness against ones developed in other advanced countries. As a result, our vegetable seeds export has been increased significantly in recent years. But we should continue to improve technique for the seed quality, especially in seed purity.

Virtually whole of commercial vegetable varieties except lettuce developed by seed companies in Korea are  $F_1$  hybrids using either male sterility, self-incompatibility, or artificial crossings depending on crops in producing  $F_1$  hybrid seeds. Although our farmers and seed importers are asking very high degree of purity for  $F_1$  hybrids, sometime there have been problems in purity of  $F_1$  hybrids seeds mainly due to instability of male sterility or self-incompatibility; and mishandling of pollinators, managers and processors.

Since 1991, majority of our F<sub>1</sub> hybrids seeds have been produced in foreign countries because of high cost of domestic production, which makes the impurity problem of F<sub>1</sub> hybrids seeds even worse. The seeds produced in overseas sometime show poor purity because management in the field can not be so thorough as done in Korea.

Therefore, these problems should be solved by the development of practical seed purity test system and also ways to improve seed purity, which would make our vegetable seed industry more competitive in the world market. This is the our target and the importance of this study.

### **III. Contents and Range of Study**

#### **1. Transformation of herbicide resistance gene**

*Bar (pat)* gene is used as the target gene in transformation because *bar* is most commonly used in herbicide resistance transformation. Pepper (Solanaceae); Chinese cabbage, cabbage, broccoli, and kale (Brassicaceae); and cucumber, and watermelon (Cucurbitae) were selected as the target crop considering the importance in Korea. We used inbred lines developed by Choongang seed company, so the result of our experiments can be immediately utilized commercially.

In case of pepper, male sterility has been used in production of F<sub>1</sub> hybrid seeds. Due to many causes such as incompleteness of male-sterility and/or mishandling of field or processing manager, the seed companies are worrying about the purity of their pepper F<sub>1</sub> hybrids seeds. Therefore, we used the restorer line (which is parental inbred) of F<sub>1</sub> hybrids as the target for the transformation. By this way, we would be able to preferentially distinguish the true F<sub>1</sub> seeds from

the ones that have been contaminated either by other pollen grains or self-pollination. In Brassicae crops lines which show self-incompatibility were the target for transformation. In cucurbitae crops also inbred lines were tried first.

Regeneration and transformation system appropriate to each crop were established. Molecular confirmation methods of transformants such as PCR analysis, Southern blot analysis, Northern blot analysis, and RT-PCR was conducted and bioassay with herbicide was also accomplished.

The progenies of transformants were obtained by self-pollination and analyzed by molecular analysis and bioassays. These plants were mixed with natural plants and treated by herbicide. The availability of this transformants in seed purity improvement was tested by this way of blind test.

## **2. Development of Practical Seed Purity Test System using RAPD**

For the establishment of seed purity test system using RAPD, RAPD markers specific to the parental line were developed with UBC random primers in pepper. These markers were converted into STS marker through DNA sequencing and STS primer production. To make this system more simple and practical, we tried to develop a new method, in which method of DNA extraction can be simplified and electrophoresis process can be skipped.

## **IV. Results of Study and Their Application**

Regeneration and transformation system was established in pepper,

broccoli, kale, chinese cabbage, cucumber and watermelon.

In pepper, regeneration itself was the threshold of transformation. So regeneration was approached in different ways. Regeneration through the organogenesis from cotyledon was successful. Based on this system the restorer of 'Kalag-kimjang No. 2' was successfully transformed with *bar* gene. About 150 T<sub>0</sub> plants were obtained and from these plants 5000 T<sub>1</sub> plants were gained. Among these, about 150 T<sub>1</sub> plants were selected by herbicide application and analyzed by PCR, southern blotting and bioassays. According to the bioassay results, there is clear difference between transformants and control plants.

Chinese cabbage, broccoli, cabbage, and kale were regenerated and transformed. The transformants were vernalized and self-pollinated. Their progenies shows herbicide resistance and were confirmed to have the introduced gene by northern blot analysis. The off-springs of broccoli transformants were proceeded to T<sub>3</sub> generation and they show resistance to herbicide in concentration of 3 times of general use.

Cucumber was regenerated by somatic embryogenesis and transformed. The transformed clons exhibits herbicide resistance in basta application. Organogenesis of transformed shoot make efficient transformation of watermelon possible. T<sub>1</sub> plants of watermelon was proved to express *bar* gene by RT-PCR.

Line specific RAPD marker were developed. For the restorer of 'Dae-myung', 1 band was found. For the maintainer of 'Dae-myung', 2 bands and for the restorer of 'Kwang-bok', 1 band, for the maintainer of 'Kwng-bok', 2 bands. The specific marker of the restorer and maintainer of 'Dae-myung' were converted into STS marker.

DNA preparation method using NaOH remarkably simplifies the

process of RAPD. Direct addition of EtBr into PCR products can expel the electrophoresis out of the procedure of seed purity test.

The blind test for the restorer and maintainer of 'Dae-myung' was conducted. The result shows complete accuracy as practical seed purity test system.

The regeneration and transformation system developed in this study is very useful one enough for other researchers to applicate in their study. The improvement of seed purity using herbicide resistance gene transformation and development of seed purity test system are thought to be able to be applied to many vegetable crops. And Choongang seed company will utilize this results in F<sub>1</sub> hybrid production. Especially seed purity test system using RAPD can be applied to any company which has the basic facilities and techniques.

Therefore, we hope the results of this study will be utilized not only by our seed companies but also by nursery men and farmers in rouging-out of off-types from their impure F<sub>1</sub> hybrids seeds.

# CONTENTS

<b>Chapter 1. Introduction</b>	
<i>Section 1. Purposes and Necessities</i>	19
<i>Section 2. Present Condition of Technical Development</i>	21
1. Seed Purity Test	21
2. Transformation of Herbicide Resistance Gene	22
<i>Section 3. Systems and Strategies</i>	26
<b>Chapter 2. Development of Purity Improving Methods in Solanaceae Crops by Herbicide Resistance Gene Transformation</b>	
<i>Section 1. Introduction</i>	29
<i>Section 2. Contents</i>	31
1. Establishment of Regeneration System of Pepper	31
2. Establishment of Transformation System of Pepper	49
3. Herbicide Resistance Gene Transformation of Pepper	60
4. Bioassays and Application to Seed Purity Test of Transgenic Pepper	63
<i>Section 3. Summary and Discussion</i>	72
<b>Chapter 3. Development of Purity Improving Method in Brassicae Crops by Herbicide Resistance Gene Transformation.</b>	
<i>Section 1. Introduction</i>	75
<i>Section 2. Establishment of Regeneration System</i>	76



1. Preparation of Plant Material	77
2. Explants and Basal Regeneration Media	78
3. Regeneration	79
4. Root Induction and Acclimatization	89
<i>Section 3. Establishment of Transformation System</i>	89
1. Target Genes	91
2. Culture Condition for <i>Agrobacterium</i>	92
3. Test for Antibiotics Tolerance	92
4. Process of Transformation	93
<i>Section 4. Transformant Analysis</i>	99
1. PCR	99
2. Southern and Northern Blotting	100
3. Seed Production for Progeny Test	103
<i>Section 5. Progeny Test</i>	105
1. Molecular Biological Analysis	105
2. Bioassay	108
<i>Section 6. Discussion</i>	111
<b>Chapter 4. Development of Purity Improving Method in Cucurbitae Crops by Herbicide Resistance Gene Transformation.</b>	
<i>Section 1. Transformation of Cucumber</i>	112
1. Establishment of Regeneration System of Cucumber	112
2. Establishment of Transformation System of Cucumber	117
<i>Section 2. Transformation of Watermelon</i>	134

**Chapter 5. Development of Material Lines for Transformation and Utilization of Transgenic Herbicide Resistant F<sub>1</sub> Hybrids**

<i>Section 1. Introduction</i>	138
<i>Section 2. Purpose</i>	138
<i>Section 3. Results</i>	139
1. Collection of Genetic Resources	139
2. Characteristics Examination and Line Development	139
3. Acclimatization and Propagation of Transgenic Plant and Selection of Homozygous Plant	145

**Chapter 6. Development of New Seed Purity Test System Using RAPD marker**

<i>Section 1. Introduction</i>	151
<i>Section 2. Contents</i>	153
1. Development of Parental line specific molecular marker by RAPD	153
2. Conversion of Parental line specific marker to STS marker	157
3. Improvement of System for Practical Use	161
4. Application to Blind Test	167
<i>Section 3. Summary and Discussion</i>	171

**Chapter 7. General Discussion** 175

**Chapter 8. Reference** 178

# 목 차

## 제 1 장 서 설

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성	19
제 2 절 국내외 기술 개발 현황	21
1. 종묘의 순도 검정	21
2. 제초제 저항성 유전자의 형질전환	22
제 3 절 연구개발 체계 및 전략	26

## 제 2 장 제초제 저항성 유전자 형질전환을 이용한 가지과 작물의 종묘 순도 향상법 개발

제 1 절 서 설	29
제 2 절 연구개발 내용	31
1. 고추의 재분화 체계 확립	31
2. 고추의 형질전환 체계 확립	49
3. 고추의 제초제 저항성 유전자 형질전환	60
4. 제초제 저항성 유전자가 형질전환된 고추를 이용한 제초제 저항성 생물 검정과 종묘 순도 검정에의 응용	63
제 3 절 연구 요약 및 고찰	72

## 제 3 장 제초제 저항성 유전자 형질전환을 이용한 십자화과 작물의 종묘 순도 향상법 개발

제 1 절 서 설	75
-----------	----

제 2 절 재분화 체계 확립	75
1. 식물재료 수집 및 종자소독	76
2. 절편체 및 재분화 기본배지	77
3. 재분화	78
4. 뿌리 유도 및 순화	89
제 3 절 형질전환 체계 확립	89
1. 도입 유전자	91
2. Agrobacterium을 위한 배양 조건	92
3. 항생제 내성 실험	92
4. 형질전환 과정	93
제 4 절 형질전환체 분석	99
1. PCR	99
2. Southern blotting/Northern blotting	100
3. 재종	103
제 5 절 후대 검정	105
1. 분자생물학적 검정	105
2. 제초제 저항성 검정	108
제 6 절 고찰	111

#### 제 4 장 제초제 저항성 유전자 형질전환을 이용한 박과 작물의 중요 순도 향상법 개발

제 1 절 오이의 형질전환	112
1. 오이의 재분화 시스템 확립	117
2. 오이의 형질전환 시스템 확립	134
제 2 절 수박의 형질전환	134

## 제 5 장 형질전환용 계통 육성 및 재초제 저항성 일대 잡종의 실용화

제 1 절 서 설	138
제 2 절 연구개발 목표	138
제 3 절 연구내용 및 결과	139
1. 유전자원의 수집	139
2. 유전자원의 특성 검정 및 계통 육성	139
3. 형질전환 식물체의 순화, 후대 유기 및 동형접합체 선발	145

## 제 6 장 RAPD 분자마커를 이용한 종묘순도 검정법 개발 및 실용화 연구

제 1 절 서 설	151
제 2 절 연구개발 내용	153
1. RAPD에 의한 품종 특이 마커 탐색	153
2. 품종 특이적 STS primer의 제작 및 특이 밴드 확인	157
3. PCR을 이용한 종묘 순도 검정법의 실용화	161
4. PCR을 이용한 종묘 순도 검정법의 실제 응용	167
제 3 절 연구요약 및 고찰	171

## 제 7 장 종합고찰

## 제 8 장 인용문헌

# 제 1 장 서 설

## 제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

전 세계가 무한경쟁시대에 들어선 21C에 이 시대를 헤쳐 나갈 유일한 방법은 현재 국가가 처한 상황을 명확히 파악하고 그에 합당한 생존전략을 세워 경쟁력을 높이는 길 뿐이다.

농업 분야에 있어서도 최근 종묘 산업을 필두로 거의 모든 분야에서 시장개발과 M&A의 바람이 거세게 불고 있으므로 이 시대의 기류에 맞추어 근본적인 국가 경쟁력의 향상이 절실히 요구되고 있다.

1996년 이후 외국 자본의 유입과 IMF 사태를 통해 우리 종묘 산업은 국제 종묘 산업계에 발을 내딛게 되었으며, 과거에 비해 우수한 품종의 개발과 종묘 품질의 향상, 명확한 홍보와 국제적인 영업력을 확보하여야만 하게 되었다. 전 세계의 종자시장은 현재 약 160억불을 넘어서고 있으며, 농업기술이 발달해 감에 따라 병저항성, 고기능성, 내스트레스성 등 우수 품종에 대한 수요가 급격히 증가하여 고부가가치 산업으로의 새로운 국면을 맞이할 것이다. 이에 따라 국내에서도 민간종묘회사를 위시하여 개인 육종자에 이르기까지 우수한 신품종에 대한 인식이 높아지고 있으며, 국가 차원에서도 육종가의 권익을 보호하기 위한 품종보호제도의 정착에 심혈을 기울이고 있다. 그리고, GMO에 대한 논란을 통해 품종과 종자에 대한 일반 대중의 의식이 높아지고 있으며, 세계 각국은 우수 품종의 개발과 홍보를 통해 종묘 시장의 주도권을 잡기 위해 총력을 기울이고 있다.

종묘산업은 본래 다양한 학문적 지식과 고도의 기술을 필요로 하는 기술집약적 산업이고, 또한 우리 농업이 나아가야 할 방향이 기술집약적인 형태라고 판단할 때 종묘산업은 우리 나라 전체 농업에서도 중요한 부분으로서 그 역할을 다 해야 하며 이를 위해 적극적인 지원과 학문적인 교류가 있어야 할 것이다.

국내 종묘업계는 그동안 우수품종의 개발에 노력해 왔고, 그 결과 일부 작물에서의 품종은 선진국과 어깨를 견주는 수준이 되어 해외 시장 개척을 통한 수출도 꾸준히 늘어왔다. 그러나, 종자의 품질 면에 있어서는 아직까지 개선해야할 부분이 많은데, 그 중에서 가장 중요한 것이 종자의 순도이다.

현재 국내 각 종묘회사에서는 일대교잡종 종자 생산을 위해서 무, 배추, 양배추의 경우에는 자가불화합성을 무, 파, 양파, 고추, 당근 등은 응성불임을 그리고 토마토, 오이, 호박, 참외, 수박 등은 인공교배를 이용하고 있다. 그러나 일대교잡 종자의 생산과정에서 자가불화합성이나 응성불임성의 불완전성, 인공교배자의 실수 및 채종포 관리자의 철저하지 못한 포장관리 등으로 인해 순수한 일대 교잡종자가 아닌 모계, 부계 또는 타화분에 의한 종자 등이 혼입되는 경우가 많고, 이것이 근래에 농민의 주요한 민원이 되는 종자 사고의 큰 원인이 되고 있다. 특히 종자생산 비용을 절감하기 위하여 1991년부터 시작된 해외 채종은 그동안 급격히 증가하여 소요량의 대부분을 차지하고 있다. 그런데, 최근 해외에서 채종한 종자의 순도가 불량하여 종자 사고의 원인이 되는가 하면 순도저하에 따른 종자의 전량폐기 사건이 발생하고 있다. 그 예로 1995년 이후 마늘, 배추, 고추, 무, 수박, 오이, 참외 등 우리 나라 중요 채소작물에 있어 종자사고의 경험이 있었다.

현재까지 민간종묘회사에서의 일대교잡종 순도검정은 국내 포장에서의 시험재배나 외국 열대지방에서의 포장 시험 재배 또는 일부 작물의 경우 선기영동방법 등을 이용하고 있으나, 이 방법들은 모두 순도 검정에 장시간이 소요되며, 막대한 노동력이 소모되고 또한 순도 검정 결과가 일정 수준에 미달하면 그 특정 농가에서 생산된 종자 전량에 대해 판정 등압을 낮추거나 폐기할 수 밖에 없는 실정이다.

이에 본 연구에서는 채소 종자의 순도 검정을 위해 최첨단의 생명공학적인 방법을 개발하여 시간과 노력의 절감은 물론 이형주를 유묘단계에서 제거하여 순수한 묘를 농민에게 공급하는 데 초점을 맞추었다. 즉 일대교

잡종의 양친 중 부계 계통에 제초제 저항성 유전자를 형질전환방법으로 이 전시키는 전략으로서 결과적으로 일대교잡 종자는 제초제에 내성을 가지게 되고 모계의 자가수정에 의한 종자 또는 타 화분에 의한 종자 등 진정한 일대교잡종이 아닌 종자는 제초제에 내성이 없으므로 육묘과정에서 제초제를 살포함으로써 간편하게 그 집단내의 순도검정 및 이형주의 제거가 가능해진다.

따라서 본 연구는 국내에서 가장 중요하며 경쟁력이 있는 채소작물들을 선정하였고 각 작물별로 형질전환 연구에 있어서 가장 우수한 연구자들로 연구팀을 구성하였으며, 최종적으로 종묘회사에서 사용할 수 있도록 산·학·연의 공동연구를 수행하고자 하였다. 또한 형질전환이 어려운 채소 작물에 대해서는 RAPD분석에 의한 DNA 마커를 개발하여 일대교잡종자 순도 검정 및 양친계 확인 등에 이용하고자 하였다.

## 제 2 절 국내의 기술개발 현황

### 1. 종묘의 순도 검정

종묘의 순도 검정은 한 품종의 종묘군에 혼입된 타 종자의 양을 검정하는 것으로서 여기서 검정된 순도에 따라 종묘의 판매여부가 결정되는 아주 중요한 단계이다. 그런만큼 각 종묘회사에서는 종묘 순도 검정에 많은 관심을 쏟고 있다. 그러나, 관행 종묘 순도 검정법은 식물체를 직접 심어 표현형을 보고 이형주를 판별하는 것이기 때문에 판별이 가능할 때까지 재배해야 하고 따라서 그에 소비되는 비용과 노동력이 매우 높다. 그러므로, 종묘의 순도 검정법의 개선이 매우 절실하며, 이에 대한 대안 가운데 하나가 생명공학적인 방법을 이용하는 것이었다.

그러나, 생명공학적인 방법이 농업에 응용되어 그 실용가능성을 보여준 1990년대에도 종자의 순도 검정에 생명공학적인 방법이 응용된 사례는 매우 적다. 1990년대 이후 학계에 발표된 생명공학적 종묘 순도 검정법은



isozyme marker를 이용한 방법과 RFLP marker를 이용한 방법, RAPD marker를 이용한 방법이 있었으나, 이들 대부분이 학계에서 보고되었을 뿐 실제로 종묘업계에서 널리 이용되지는 못하고 있다.

생명공학적인 방법을 이용하여 개선한 종묘 순도 검정법이 실제 현장에서 널리 이용되지 못하고 있는 이유는 첫째, 그에 이용되는 생명공학적인 기술이 현장에서 이용되기에는 너무 복잡한데다 숙련이 필요하고, 둘째 그에 드는 비용이 식물체를 재배하여 검정하는 것에 비해 오히려 많이 소요된다는 것에 있다고 본다. 그러므로, 직접 현장에서 이용될 수 있는 간편하고도 정확한 순도 검정 기술의 개발이 아직도 절실히 요구되고 있는 데 비해 아직까지 그에 대한 연구가 부족한 실정이다.

## 2. 제초제 저항성 유전자의 형질전환

제초제 저항성 유전자의 형질전환은 본 연구가 시작된 95년이래 눈부신 성과를 보여주었다. Glyphosate계열의 제초제 근사미에 저항성인 대두 Round-up ready의 출시는 그동안의 GMO 논쟁의 핵심이 될 정도로 많은 관심을 불러 일으켰으며, 실제로 미국 대두 종자 시장의 30%를 차지하였다. 그후 옥수수, 면화, 담배, 유채 등의 작물에서 계속 제초제 저항성 형질전환 품종이 선을 보였으며, glyphosate 계열의 제초제뿐만 아니라 bromoxynil, glufosinate 계열에 저항성인 품종들도 판매되기 시작하였다. 제초제 저항성 형질전환 품종이 전체 GMO의 절반이상을 차지할 정도로 개발이 많이 된 것은 이들 품종의 개발 주체가 종묘회사가 아닌 농약회사들로서 자사의 제초제와 제초제 저항성 품종을 묶어 판매하는 전략에 적합했기 때문이다. 제초제 저항성 형질전환 품종의 개발은 찬반 논란을 일으켰고, 아직도 그 논란 가운데에 있지만 이러한 제초제 저항성 품종이 앞으로 개발될 영양 강화 품종, 고기능성 품종 등 소비자에게 유리한 형질전환 품종의 시발점이라는 것을 감안한다면 형질전환 품종의 미래는 밝다고 보아야 할 것이며, 우리 나라의 주작물에 대해서도 형질전환 연구가 계속 되

어야 앞으로의 국제 경쟁에 뒤처지지 않을 수 있을 것이다.

### 가. 제초제의 작용 기작 연구

제초제의 작용에 대해서는 다음과 같이 밝혀져 있다.

먼저 chloroplast의 제 2광계의 전자전달을 방해하여 광합성을 저해하는 것으로서, urea계 제초제와 triazine계 제초제, triazinone계 제초제, uracil계 제초제, anilide계 제초제, phenylcarbamate계 제초제 등이 이에 속한다. 이와 비슷하게 chloroplast의 제 1 광계의 전자전달을 방해하여 광합성을 저해하는 제초제가 있는데, 여기에는 bipyridinium계 제초제가 속하는 것으로 알려져있다. 이러한 제초제들은 광에 의한 과산화 작용을 통해 틸라코이드막과 여러 세포막의 지질을 파괴하여 식물을 죽게 한다.

둘째로 색소체 생합성을 저해하여 광합성을 방해하는 제초제들이 있다. 여기에는 diphenyl ether계 제초제와 백화형 제초제들이 있다. 이들은 엽록체의 과산화를 막지 못하게 함으로써 광합성을 저해하는 것으로 알려져 있다.

셋째로 지질생합성을 억제하는 제초제들이 있다. 여기에는 Aryloxy-phenoxypropionate계, thiocarbamate계, chloroacetamide계 제초제들이 속하는데, 지질의 생합성이 억제되면 세포막의 합성이 저해되고 따라서 성장점과 유조직이 황화되어 고사한다.

넷째로 아미노산 생합성 저해제들이 있다. 이 계열의 제초제들은 요즘 가장 주목을 받고 있는 제초제들로, 아미노산 생합성을 억제하기 때문에 그 효과가 크고, 비선택성인 반면 박테리아로부터 분리한 저항성 유전자들은 드물지 않기 때문에 이를 작물에 전이하여 제초효과를 극대화할 수 있다는 장점이 있다. 여기에는 EPSPS (5-enoyl-pyruvyl shikimic acid 3-phosphate synthase)를 저해하는 glyphosate계 제초제, ALS (acetolactate synthase)를 저해하는 sulphonylurea계 제초제, imidazolinone계 제초제와 triazolopyrimidine계 제초제, glutamine synthase를 저해하는 glufosinate

계 제초제, 히스티딘 생합성을 억제하는 aminotriazole이 있다. 이들은 아미노산생합성을 억제하여 식물 세포가 정상적인 대사를 진행하지 못하여 죽게 만든다고 알려져 있다.

나. 제초제 저항성 유전자의 작용 기작 연구와 제초제 저항성 유전자의 클로닝  
지금까지 알려진 제초제 저항성은 크게 세 가지로 분류된다.

먼저 제초제의 흡수나 식물체 내 이동을 차단하는 기계적인 저항성이 한 부류이다. 이러한 저항성은 실제로 제초제 저항성 작물을 만드는 데에는 큰 도움이 되지 못한다.

또 한가지의 종류는 제초제의 대상이 되는 특정효소의 돌연변이이다.

Glyphosate계 제초제의 작용점인 EPSPS의 경우, 이 효소 자체가 변형되어 glyphosate에 의해 저해되지 않게 된 돌연변이 유전자들을 박테리아인 *Salmonella typhimurium*, *Agrobacterium tumefaciens*, 식물인 *Petunia*와 *Arabidopsis thaliana*에서 찾았고, 이중에서 *Agrobacterium*에서 클로닝된 유전자가 Monsanto사에 의해 대두에 전이되어 roundup-ready 품종으로 탄생하였다.

ALS도 EPSPS와 마찬가지로 효소가 돌연변이를 일으켜 저항성을 갖게 되는데, 이 효소는 *Arabidopsis thaliana*, corn, tomato, tobacco등에서 클로닝되어 제초제 저항성 유전자로서 형질전환된 바 있다. 또한 atrazine의 작용점인 *psbA* 유전자도 돌연변이를 일으켜 저항성을 가지게 된 유전자가 클로닝되었다.

다른 종류로서 제초제를 분해하거나 무독화시키는 효소를 통해 저항성을 가지게 되는 경우가 있는데, 이러한 효소는 주로 미생물에서 발견된다. 이 종류의 대표적인 경우가 본 연구에서 사용한 *bar* 유전자이다. 이 유전자는 glufosinate의 주성분인 phosphinothricin의 acetyl 기를 이동시킴으로써 무독화시키는 효소를 만들어 내는데, 이것은 토양세균인 *Streptomyces hygroscopicus*에서 클로닝되었다.

Bromoxynil계 제초제를 분해하는 Nitrilase도 이 종류에 속하는 저항성의 원인이다. 이 nitrilase는 bromoxynil의 cyano group을 carboxyl group으로 변환시키는데, *Klebsiella ozaenae*에서 클로닝되어 유용하게 사용되고 있다.

옥신계 제초제를 비활성화시키는 2,4-D monooxygenase도 이에 속하는데, 이것은 옥신행 제초제의 side chain을 분리시켜 옥신으로서의 기능을 봉쇄함으로써 저항성을 갖게 한다.

이러한 제초제 저항성 유전자는 식물에 이전되어 제초제 저항성 품종을 개발하는 데도 쓰이나 다른 목적 유전자의 형질전환 과정에 있어서 선발표지로서 쓰이는 경우가 더 많다. 즉, 제초제 저항성 유전자가 매우 다양하게 쓰일 수 있기 때문에 특히 개발이 가속화되어 있으며, 특히에 관련된 움직임도 활발하다.

#### 다. 작물별 재분화와 형질전환 체계

식물의 재분화는 1957년 담배의 캘러스로부터 shoot와 뿌리가 유기되면서부터 지금까지 작물과 방법을 넓혀가면서 진행되어 왔다. 십자화과의 경우에는 전세계적으로 많이 연구된 양배추, 유채, 브로콜리 등은 형질전환이 케도에 올라 양배추나 유채의 경우 해외에서 제초제 저항성, 병 저항성, 해충 저항성 등의 유전자가 형질전환된 품종이 포장실험 중이거나 시판중이다. 그러나, 부와 케일, 배추 등 우리 나라에서 주로 재배되는 십자화과의 경우에는 연구된 사례가 드물고 아직까지 형질전환에 대한 보고도 없다. 이것은 이 작물들이 일반적인 십자화과 작물과는 다르게 재분화 조건이 까다로와 아직까지 그 체계가 잡히지 않은 데에 기인하며, 이를 개선하기 위한 연구가 진행 중이다.

박과의 경우 오이는 형질전환에 대한 보고가 많이 있고 해외에서는 포장실험 중인 예도 찾을 수 있으나, 수박의 경우에는 최근에 들어 몇몇 보고가 있는 상태로서 형질전환의 초기 단계이며 아직 일반적으로 적용될 수

있는 형질전환 체계를 확립했다고 보기는 어려운 상황이다.

가지과의 경우 토마토와 담배는 형질전환이 일상적으로 진행되는 것으로 알려져 있으나 고추에 대한 연구는 매우 미흡한데 특히 우리 나라에서 재배하는 매운 고추의 경우에는 보고된 논문도 6편 정도로 매우 적고 일상적으로 진행되는 연구팀도 매우 적다. 그 이유는 고추의 경우에도 재분화가 어렵고 한 품종에서 효율적인 조건도 다른 품종에서는 비효율적이 되는 등 기준으로서 이용할 수 있는 체계가 없기 때문으로 이에 대한 체계적인 연구가 필요한 상황이다.

전체적으로 우리 나라에서 주로 재배하는 작물의 경우에는 세계적으로 연구가 드물어 재분화와 형질전환에 대한 보고를 찾아보기 어렵고 따라서 국내 연구팀들이 해결해야 할 과제가 되고 있으며, 오히려 국내의 농업생명공학 기술을 개발할 수 있는 기회가 되고 있다.

작물의 형질전환 체계에 관한 연구와 함께 진행되어야 할 연구가 형질전환된 유전자가 후대에서도 안정적으로 발현되게 하기 위한 연구들이나 이 부분에 대해서는 gene silencing의 기작에 관한 몇 가지 가설이 있을 뿐 특정 작물에서 gene silencing이 자주 일어나는 이유나 후대에서의 안정성이 떨어지는 이유에 대해서는 아직까지 큰 진전이 없는 실정이다.

### 제 3 절 연구개발 체계 및 전략

본 연구에서는 채소 종묘의 순도 검정 방법을 개선할 뿐만 아니라 순도 자체를 향상시킬 수 있는 방법을 개발하기 위해 제초제 저항성 유전자의 형질전환을 이용한 실용적인 순도 향상법의 확립을 목표로 하였고, 형질전환이 어려운 작물이나 또는 간단한 순도검정이 요구되는 경우에 응용할 수 있도록 RAPD를 이용한 실용적인 순도 검정 체계를 개발하였다.

제초제 저항성 유전자를 형질전환할 대상 작물로는 국내에서 주로 재배되며 그 생산량이나 재배면적 면에서 중요성을 갖는 작물을 선택하였는데, 가지과에서는 고추를, 십자화과에서는 배추, 브로콜리, 케일을 박과에서는

오이와 수박을 대상으로 선택하였다.

가지과 작물 중 고추의 경우 일대교잡종자를 채종하는 데 응성불임을 이용하는데, 대부분의 경우 응성불임이 완벽하지 못하기 때문에 생기는 자가수분 종자나 타 화분의 유입에서 기인하는 오염수분에 의한 혼입종자로부터 진정 일대교잡종자를 선별해 내기 위해 일대교잡종의 화분친에 제초제 저항성 유전자를 형질전환하였다.

십자화과 작물의 경우에는 일대교잡종자의 생산에 자가불화합성을 이용하므로 종묘회사에서 실제 이용하는 육종 소재의 자가불화합성 계통에 제초제 저항성 유전자의 형질전환을 수행하였으며, 기존의 기관분화를 이용한 재분화 체계를 각 십자화과 계통에 맞게 조정하여 이용하였다.

박과 작물의 경우는 자화와 응화가 따로 개화하기 때문에 응성불임이나 자가불화합성을 이용하지 않고 인공교배로 채종하게 된다. 그러므로 박과 작물 또한 우선 화분친에 제초제 저항성을 부여하여 진정 일대교잡종자를 선별해낼 수 있도록 하고 모친에 대한 확실한 정보를 제공할 수 있도록 모친계통도 따로 형질전환을 수행하도록 하였다. 또한 오이의 경우에는 체세포배를 이용한 효율적인 재분화 체계가 확립되어 있으므로 이를 이용하여 형질전환을 진행하였다.

형질전환을 수행하는 식물재료는 일단 형질전환에 성공하면 일대잡종의 채종체계에 도입하는 것이 최소한의 시간 안에 진행될 수 있도록 중앙종묘사의 기존 계통을 분양받아 이용하였으며, 일단 형질전환된 것이 확인되면 중앙종묘에 다시 분양하여, 생물검정과 후대 진전, 기존 계통과의 교배 등은 중앙종묘에서 진행하였다.

형질전환에 쓰이는 제초제 저항성 유전자는 그 효과가 가상 널리 인정되고 있는 *bar*를 사용하였으며, 경우에 따라서는 *bar* 외에 잎을 크게 하는 유전자나 응성불임 유도 유전자 등 각 작물에 유용한 유전자를 함께 도입하였다.

형질전환체의 형질전환 여부는 각 작물별 형질전환 연구팀에서 분자적

검정과 생물검정을 통해 결정하였으며, 이 과정에서 확인된 형질전환 개체는 중앙종묘에 옮겨져 이후 후대 진전과 생물검정을 실시하였고, 일대교잡 종자의 작성에도 응용되었다.

제초제 저항성 유전자가 동형접합 상태인 형질전환 계통과 비형질전환 계통 사이에서 작성된 일대교잡 개체를 이용하여 제초제를 살포함으로써 실제 순도 검정을 수행하였고, 그 결과로 본 연구의 결과가 채소 종묘의 순도 향상에 쓰일 수 있는지 검토하였다.

고추와 같이 형질전환이 어려운 작물에 있어서는 형질전환과 함께 이용할 수 있도록 RAPD를 이용한 실용적인 순도 검정 방법을 개발하려 하였으며, 이것이 육종현장에서 실용적으로 이용될 수 있도록 다른 방법들과 같이 random primer를 이용한 RAPD 마커를 개발함과 함께 DNA 추출을 간편하게 할 수 있는 방법을 개발하고, 전기영동과정을 생략할 수 있도록 개발된 RAPD 마커를 STS 마커로 전환하였으며, PCR 산물의 확인 방법을 다양하게 개발하였다. 개발된 체계는 직접 중앙종묘에서 순도 검정을 의뢰받아 실제 순도 검정에 응용하여 보았으며, 그 결과로 실제 사용 가능성을 검정하였다.

## 제 2 장 제초제 저항성 유전자 형질전환을 이 용한 가지과 작물의 종묘 순도 향상법 개발

### 제 1 절 서 론

고추(*Capsicum annuum* L.)는 남미의 불가리아가 원산지인 것으로 알려진 가지과 작물로서 신대륙 발견 이후 유럽에 전달되었고 이후 세계 각지에 널리 퍼지게 되었으며, 우리 나라에는 1614년에 일본으로부터 도입된 기록이 있다. 이렇듯 짧은 재배역사에도 불구하고 우리나라에서 고추는 없어서는 안 될 채소로서 풋고추로 이용하거나 고춧가루로 사용되는데, 1999년 현재 국민 1인당 평균 소비량이 2.2 kg에 달하고 있다. 우리나라 고추 재배 면적은 연 평균 80,000 ha에 달하고 총 생산액이 1조 3천억원으로서 단일작물로는 비 다음으로 중요한 원예작물이다. 또한 조수익이 높은 작물로 농가당 평균 순수익을 1,634,000원을 안겨 줌으로써 마늘, 양파와 함께 농가의 큰 수입원이 되고 있다. 따라서 고추는 우리나라에서 식생활은 물론 농가경제에 있어서도 가장 중요한 원예작물 중 하나이다. 근래에 들어 고추는 우리나라만이 아니라 거대시장인 중국은 물론 인도네시아 등 동남아시아 지방의 수요와 기호에 맞추어 품종을 개발함으로써 수출량이 급격히 늘어나고 있는데, 이러한 상황으로 볼 때 고추는 국내 시장만이 아닌 세계 시장에서 우리 중묘산업의 국제 경쟁력을 높여줄 작물로서도 매우 중요하다.

지난 20 여년 간 우리나라의 고추 재배 농가의 토지생산성은 2배 이상 향상되었다. 1976년 이후 5년 평균 10 a당 건고추 생산량의 변화 추이를 살펴보면 '76-'80에는 109 kg에 불과했으나, '81-'85년에는 124 kg, '86-'90년에는 188 kg, '91-'95년에는 212 kg, '96-'99년에는 252 kg으로 급격히 증가하였다. 이는 1970년경부터 일반화되기 시작한 PE 멀칭 효과와 함께



재래종에 비해 생산성이 월등히 높은 일대교잡종 품종의 육성과 보급에 의한 것으로 생각된다. 우리 나라에서 고추의 일대교잡종은 1970년대 초반에 농가에 보급되기 시작하여 1980년 중반에는 그 보급률이 급속히 증가하였고, 1990년대 이후부터는 거의 100% 일대교잡종만을 재배하고 있는 실정이다. 현재 민간 종묘회사에서 시판하는 일대교잡종은 국내 육성 품종 437개, 수입 품종 10개로서 총 447개에 달하고 있으며, 이들의 종자 생산량은 1999년에 122,002 L였고, 이중 해외에서 채종한 종자의 양은 109,918 L였다. 95년부터 4년 간에도 고추 일대교잡품종은 213개에서 437개로 두 배 이상 증가하였으며, 해외 채종량은 20-25%에서 90%로 급격히 증가하여, 고추 일대 잡종 품종의 채종에 있어서 해외 채종이 주가 되었다.

고추는 종자 생산에 드는 비용과 노동력을 절감하기 위해 웅성불임(male sterility; MS)을 사용한다. 고추에 현재 사용되는 웅성불임에는 GMS (genic male sterility)와 CGMS (cytoplasmic and genic male sterility)가 있다. GMS는 채종 단계에서 모계의 웅성불임체와 웅성가임체가 1:1로 분리하게 되므로 이중에서 웅성가임체를 선발해 버리는 단계가 필요한데, 이 과정에 노동력과 시간이 많이 들고 실제 소요량의 2배를 육묘하여야 하는 문제가 있다. CGMS에 있어서 웅성불임이 도입된 모계는 모두 웅성불임이어야 하나 실제로는 완전하지 못한 경우가 대부분이어서 종자친의 자가수분이 종종 일어나고 이로 인해 불순 종자가 발생하여 종묘의 순도를 낮추는 것으로 연결된다. 채종포장에서의 다른 문제 하나는 화분친과는 다른 계통의 화분이 수분되어 종자를 맺는 오염수분이다. 이러한 종자들에 의해 종묘의 순도가 낮아지게 되며, 일정 기준 이하의 순도를 가진 종자들은 폐기되게 된다.

본 연구는 일대교잡종 고추의 화분친에 제초제 저항성 유전자를 형질전환시킴으로써, 종자친의 자가수분에 의한 종자나 다른 화분친에 의해 생산된 종자를 손쉽게 제초제를 살포하는 것만으로 진정 일대교잡 종자와 구분해 낼 수 있도록 하는데 목적이 있다. 특히, 이 방법은 채종된 일대 잡종

종자의 순도 검정에만 응용되는 것이 아니라 제초제를 살포하였을 때 살아 남은 개체들은 진정 일대교잡 종묘가 확실하므로, 다른 종자가 많이 혼입 되어 기존의 방법들로는 폐기하여야만 하는 종자군의 경우에도 유묘기에 제초제를 살포하여 진정 일대교잡 종묘만을 선별하고 판매할 수 있도록 할 수 있기 때문에 종묘업체의 손실을 막을 수 있다. 또한 농민들도 진정한 일대교잡종만을 구입할 수 있으므로 종묘업체와 농민들 모두에게 이익을 주는 일석이조의 효과를 가져올 수 있다.

## 제 2 절 연구개발 내용

### 1. 고추의 재분화 체계 확립

#### 가. 연구 재료 및 방법

##### 1) 자엽을 이용한 재분화 체계 확립

자엽을 이용한 재분화 체계를 확립하는 데 이용한 기본배지로는 MS 배지에 3% sucrose와 0.8% agar를 첨가하여 pH 5.7로 조정한 배지를 사용하였다.

먼저 고추에서 자엽을 이용한 안정적인 재분화 체계를 확립하기 위해 사용한 재료는 홍농종묘사의 일대교잡종인 “금탑”이었다. “금탑” 품종은 고추 품종 중 재분화가 가장 우수하다고 알려져 있으며, 따라서 재분화 체계 확립을 위한 연구 재료로서는 가장 적합하다고 사료되었다. 고추의 재분화에는 식물 성장조절제로서 auxin계 호르몬인 NAA와 cytokinin계 호르몬인 TDZ와 zeatin이 사용되었다.

고추 자엽에서 유도한 shoot의 신장에 적합한 호르몬 농도를 알기 위해 사용한 식물재료로는 홍농종묘사의 일대교잡종인 “금탑”, “부강”, “풍촌”과

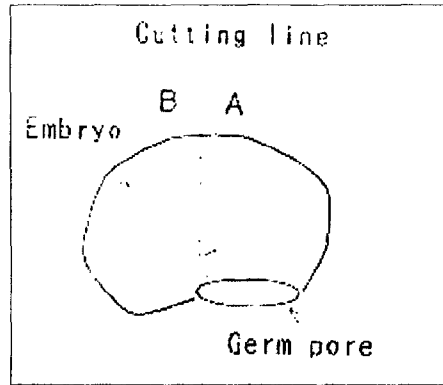


그림 1. 고추 종자에서 half-seed의 준비 방법 (Ezura *et al.*, 1993).

A part가 half-seed

중앙종묘사의 일대교잡종인 “가락김장 2호”를 사용하였다. 이들을 shoot 유도 배지에 치상하여 얻은 shoot를 shoot 유도 배지에서 NAA의 농도를 조정된 배지에 치상하여 그 효과를 보았다.

항산화물질과 암치리를 이용한 shoot induction 효율 개선 효과를 보기 위한 식물재료로는 “금탑”의 자엽을 이용하였고, 항산화물질로는 ascorbic acid, citric acid와 charcoal을 각각 100 mg/L, 150 mg/L, 3 g/L로 처리하여 그 효과를 보았다.

## 2) Half-seed를 이용한 재분화 체계 연구

Half-seed로부터 shoot를 유도하는 식물재료로는 중앙종묘사의 일대교잡종인 “가락김장 2호”와 “청양”을 주로 이용하였고, “가락김장 2호”의 회복친 계통과 유지친 계통을 이용하여 half-seed로부터 재분화시키는 방법의 효율을 보았다. Half-seed는 AgNO<sub>3</sub>와 GA<sub>3</sub>가 half-seed로부터의 shoot 신장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 농도별로 처리하였으며, 이 체계를 이용하여 형질전환을 시도하였다.

### 3) 체세포배를 이용한 재분화 체제 연구

본 연구에 사용된 배지로는 MS 배지(Murashige와 Skoog, 1962)에 1mg/L 2,4-D와 6% sucrose를 첨가하고 pH 5.79-5.81로 조정하고 8 g/L agar를 첨가한 배지를 기본배지로 사용하였으며, 치상절편체는  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 2000 Lux의 광을 16시간 일장으로 조사하는 조건에서 배양되었다.

다양한 절편체를 이용하여 체세포배를 유도하고자 하는 실험을 진행하였으며, 식물체의 자엽, 하배축 및 정단부를 치상하기 위한 식물재료는 중앙종묘의 시판품종인 “가락김장 2호”를 무균발아시켜 사용하였다. Half-seed의 치상재료로도 “가락김장 2호”의 종자에서 준비하였으며, 미성숙접합자배는 ‘가락김장 2호’의 회복친 계통을 자가수분시켜 35일 된 것을 이용하였다.

여러 가지 절편체 중 체세포배 유사구조의 형성에 효과가 있었던 미성숙접합자배의 크기에 따른 유도율의 차이를 보기 위하여 “가락김장 2호”의 회복친 계통 식물체에서 자가수분한 날로부터 2-3주, 3-4주, 4-5주 지난 과실을 채취하여 표면살균한 후 절개하여 각각 2-3 mm, 4-5 mm, 6-7 mm의 배를 적출하여 이용하였다.

Cytokinin의 첨가가 체세포배 유사구조의 형성에 미치는 영향을 보기 위하여 “가락김장 2호”의 회복친 계통 식물체에서 자가수분한 날로부터 30-35일 되는 미성숙 접합자배를 채취하여 기본배지에 각각 BA, thidiazuron, zeatin, coconut water를 첨가하여 치상하였으며, coconut water는 농도를 더 세분화하여 실험하였다.

식물체의 유전형이 체세포배 유사구조의 형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 *Capsicum annuum*에 속하는 것으로 중앙종묘의 F<sub>1</sub> 품종 ‘가락김장 2호’, ‘청양’, ‘대명’, ‘조홍’, ‘광복’, 흥농종묘의 F<sub>1</sub> 품종 ‘부강’, ‘풍촌’, ‘금탑’, 한농종묘의 F<sub>1</sub> 품종 ‘향촌’, 중앙종묘에서 분양받은 ‘가락김장 2호’의 유지친 계통과 회복친 계통을 이용하였고, *C. baccatum*과 *C. chinense*로는 실험실에서 보유하고 있는 계통을 식물재료로 이용하였다.

나. 연구결과

1) 자엽을 이용한 재분화 체계 확립

가) Shoot induction에 적합한 호르몬 농도 구명

금담 고추의 자엽을 절편체로 이용하였을 때 shoot primordia가 가장 많이 생기는 조합은 0.05 mg/L NAA와 2.0 mg/L zeatin을 사용한 조합이었다(표 1, 표 3). 고추의 재분화에 좋은 영향을 준다고 보고되었던

표 1. Shoot primordia 형성에 미치는 zeatin 농도별 효과

PGR 농도 (mg/L)		재분화 정도			
NAA	Zeatin	치상 절편체 수	shoot primordia 발생 절편체 수	shoot primordia 형성 정도	비고
0	0	30	0	-	뿌리형성
	0.25	30	28	+	
	0.5	20	20	++	
	1	30	25	++	
	2	30	30	+++	
	4	30	29	++++	
0.05	0	30	0	-	뿌리형성
	0.25	20	20	++	
	0.5	20	20	++	
	1	30	30	+++	
	2	30	29	++++	
	4	20	19	++++	
0.1	0	30	0	-	뿌리형성
	0.25	30	30	+	
	0.5	20	20	++	
	1	20	20	+++	
	2	20	20	+++	
	4	20	19	+++	

thidiazuron (TDZ)을 사용하였을 때에는 절편체에서 형성된 shoot primordia의 수는 zeatin과의 차이가 없었으나, 이로부터 유도된 shoot는 제대로 된 모양을 갖추지 못하고, 크게 부풀어오르다가 그대로 생장을 멈추는 경우가 많았다. TDZ를 사용하였을 경우에 가장 많은 shoot primordia를 얻을 수 있는 조합은 0.05 mg/L NAA와 0.5 mg/L TDZ를 사용한 조합이었다(표 3). Zeatin에서 유도된 shoot들은 이와는 달리 잎과 비슷한 모양을 갖추고 성장하였다. 그러나, 이들도 그 후에 성장점이 발생하지 못하고 그대로 생장을 멈추었으며, 더 이상의 분화나 신장이 일어나지

표 2. Shoot primordia 형성에 미치는 thidiazuron 농도별 효과

PGR 농도 (mg/L)		재분화 정도			
NAA	thidiazuron	치상 절편체 수	shoot primordia 발생 절편체 수	shoot primordia 형성 정도	비고
0	0	30	0	-	뿌리형성
	0.002	30	2	-	
	0.01	30	0	-	
	0.05	30	28	+	
	0.25	20	16	++	
	1.25	30	28	++	
0.05	0	30	0	-	뿌리형성
	0.002	30	0	-	
	0.01	30	3	-	
	0.05	30	27	+	
	0.25	30	30	+++	
	1.25	30	30	+++	
0.1	0	30	0	-	뿌리형성
	0.002	30	0	-	
	0.01	30	0	-	
	0.05	30	22	+	
	0.25	30	30	+++	
	1.25	30	30	++++	

표 3. 고추에 있어서 식물생장조절제의 종류와 농도에 따른 재분화율

PGR (mg/L)			치상 절편체 수	shoot primordia 발생율 (%)	shoot primordia 수/ 절편체
NAA	TDZ	Zeatin			
0.05	0.25	0	100	15	1.5
0.05	0.5	0	100	26	7
0.05	0	1.0	80	19	2
0.05	0	2.0	80	24	7.5
0.1	0.25	0	100	16	1
0.1	0.5	0	100	17	1.5
0.1	0	1.0	80	17	1
0.1	0	2.0	80	18	1.5

못하였다.

이러한 shoot의 기형화와 이상분화 현상은 shoot의 신장에 알맞은 조건을 갖추어 주지 못한 것으로 생각되었으며, 따라서 신장에 알맞은 배지 조건을 찾기 위해 여러 품종을 대상으로 실험을 수행하였다(표 4).

나) Shoot elongation에 적합한 호르몬 농도

금탑, 부강, 풍촌과 가락김장 2호 품종의 유식물체의 자엽을 이용하였

표 4. 고추 품종에 따른 배지별 호르몬 농도

품종 배지	금 탑	부 강	풍 촌	가락김장 2호
Shoot induction	0.05 mg/L NAA + 2 mg/L zeatin	0.02 mg/L NAA + 2 mg/L zeatin	0.05 mg/L NAA + 2 mg/L zeatin	0.05 mg/L NAA + 2 mg/L zeatin
Shoot elongation	0.01 mg/L NAA + 2 mg/L zeatin	0.01 mg/L NAA + 2 mg/L zeatin	0.05 mg/L NAA + 2 mg/L zeatin	-
Root induction	-	-	-	-

을 때, shoot를 유도하기 위해 사용했던 배지에서 NAA의 농도를 낮추어 줌으로써 신장된 shoot를 약간 얻을 수 있었으며, 변형된 농도는 표 4와 같다. 이러한 shoot의 신장은 배지 중에 AgNO<sub>3</sub>를 첨가함으로써 더욱 촉진되었다.

그러나, 효율적인 형질전환을 수행할 수 있을 정도로 재분화 개체를 얻을 수 없었으며, 이를 해결하기 위하여 NAA 대신 같은 auxin계열의 식물 호르몬이면서도 천연물질인 IAA를 이용하였고, zeatin의 농도도 대폭 높였다. 또한, 형질전환을 수행하는 과정에서의 재분화 실험 결과와 형질전환 조건이 아닌 상태에서의 재분화 실험 결과가 다를 수 있을 것이라 예상하여 이후 자엽을 이용한 식물체 재분화 실험은 Agrobacterium을 접종하는 형질전환 과정에서 이루어졌다.

다) 항산화물질과 암처리를 이용한 Shoot induction 효율 개선

고추 유식물체에서 절편체를 절취하여 치상한 뒤 광조건에서 배양할 경우, 경우에 따라 절편체가 쉽게 노화되는 경우가 있었으며, 이러한 현상을 방지하기 위해 절편체를 치상한 후 암조건에서 배양한 결과 3일간 배양하

표 5. Antioxidant 처리에 따른 shoot primordia 발생 절편체 비율

Antioxidants			Shoot primordia 발생 절편체 비율 (%)
Ascorbic acid	Citric acid	charcoal	
-	-	-	28
100 mg/L	-	-	32
-	150 mg/L	-	34
-	-	3 g/L	34
100 mg/L	150 mg/L	-	36
100 mg/L	-	3 g/L	32
-	150 mg/L	3 g/L	32
100 mg/L	150 mg/L	3 g/L	30



있을 때 절편체의 노화와 갈변을 줄일 수 있었다. 그리고, 치상조직이 갈변하는 것을 방지하기 위해 ascorbic acid, citric acid, charcoal 등의 항산화 물질을 처리한 결과, 이들을 첨가함으로써 갈변을 줄이고 shoot primordia 발생 효율을 높일 수 있었다. 따라서 형질전환 과정 중에 절편체의 갈변이나 노화 현상이 나타나는 경우에는 암처리와 항산화물질의 첨가가 도움이 되었다.

## 2) Half-seed를 이용한 재분화 체계 연구

자엽을 절편체로 이용하여 재분화시킬 때에는 shoot의 신장이 매우 어려웠으며, 그로 인해 이 과정이 재분화 전체 과정의 병목이 되었다. 따라서 shoot를 좀 더 쉽게 신장시키기 위해 지금까지 보고되었던 고추의 재분화 방법 중 효율이 있었던 여러 방법들을 적용하였다.

### 가) Half-seed로부터 shoot를 유도하는 데 적합한 호르몬 농도

Half-seed를 절편체로 이용하였을 경우, 가락김장 2호 품종과 청양 품종, 가락김장 2호의 유지친 계통과 회복친 계통 모두에서 90% 이상의 효율로 shoot를 유도할 수 있었다. 이 때 배지는 0.02 mg/L IAA, 2 mg/L zeatin, 3% sucrose, 0.8% agar를 첨가한 MS배지였으며, 자엽이나 분엽 또는 하배축을 절편체로 이용했을 때에 비해 shoot의 유도와 신장이 매우 잘 되었다(표 6).

### 나) AgNO<sub>3</sub>와 GA<sub>3</sub>가 half-seed로부터의 shoot induction에 미치는 영향

표 6. 여러 가지 explant에 따른 shoot induction 효율 비교

Explant Cultivar	Cotyledon	Hypocotyl	Young leaf	Half-seed
가 락	+	++	-	++++
청 양	+	++	-	++++

표 7. Shoot elongation에 효과적인 AgNO<sub>3</sub>의 농도

Shoot Elon.(%) AgNO <sub>3</sub> con.(mg/L)	가 락	청 양
0	-	-
1.25	+	+
<b>2.5</b>	<b>++</b>	<b>++</b>
5	+++ (기형적)	+++ (기형적)

이렇게 유도된 Shoot는 같은 조성의 배지에 2.5 mg/L AgNO<sub>3</sub>를 첨가한 배지에 개대하면 빠른 속도로 신장하였다. 그러나, AgNO<sub>3</sub>를 유도단계부터 처리하거나 고농도로 처리하는 것은 shoot의 수는 늘릴 수 있었으나 기형 shoot가 많이 나타나 재분화 전체 과정으로 보면 오히려 좋지 않은 결과를 보였다(표 7). 또한 신장 배지에 2 mg/L GA<sub>3</sub>를 AgNO<sub>3</sub>와 함께 첨가하면 shoot의 신장이 더욱 촉진되었다(표 8).

#### 다) Half-seed를 이용한 재분화 방법의 특성

Half-seed를 절편체로 이용하는 방법은 shoot를 얻기가 쉬울 뿐 아니라 완전히 재분화된 식물체를 획득하는 데 걸리는 소요기간도 다른 방법에 비해 짧았다. Half-seed를 치상하여 shoot를 얻어내는 데에는 2주일 정도의 시간이 소요되었으며, 이 shoot를 신장시키고 완전히 재분화된 개체는 2달 정도의 기간 안에 얻을 수 있었다.

Half-seed를 이용한 재분화 방법은 가락김장 2호 품종만이 아니라 청양, 가락김장 2호의 유지친 계통과 회복친 계통 모두에서 높은 효율을 보였으며, 따라서 이 방법은 다른 품종이나 계통에도 광범위하게 이용이 가능하리라 생각되었다.

그러나, 이 방법은 Agrobacterium을 접종하여 형질전환을 시도하였을 때에는 그 결과가 좋지 않았는데, 그 이유는 kanamycin이 포함된 선발배



그림 2. Half-seed를 절편체로 이용한 재분화 방법

- 좌) Half-seed로부터 유기한 shoot
- 우) Half-seed로부터 재분화된 완전한 식물체

지에 치상하였을 때에도 kanamycin이 첨가되지 않았을 때와 거의 같은 속도와 비율로 shoot가 형성되고 분화하여 사실상 선발이 거의 불가능하였기 때문이다. 이는 half-seed를 이용하여 분화시킬 때 그 분화 속도가 너무 빨라 kanamycin의 영향을 거의 받지 않는 것으로 해석되었다. 따라서 재분화 체계로는 아주 우수한 방법으로 사려되었으나, 형질전환체계로서 이용하기에는 무리가 있다고 판단하였다.

### 3) 체세포배를 이용한 재분화 체계 연구

자엽을 이용한 재분화 방법의 난점이었던 shoot의 신장을 해결함과 동시에 많은 수의 형질전환 대상체를 얻기 위하여 체세포배를 이용한 재분화 체계를 연구하였다. 체세포배는 기관분화를 이용한 재분화에서 얻어지는

표 8. GA<sub>3</sub>가 shoot의 신장에 미치는 영향

Cultivar		가 락	칭 양
Medium(mg/L)	GA <sub>3</sub>		
Zeatin 2.0	0	+	+
IAA 0.02	1	+	+
AgNO <sub>3</sub> 2.5	2	++	++

shoot와는 달리 apical meristem과 root meristem을 모두 가지고 있으므로 일단 체세포배를 얻기만 하면 자연적으로 얻어진 접합자배와 같은 성장과정을 거치게 된다. 또한 체세포배를 다량 얻어내면 shoot를 이용했을 때보다 더 많은 재료를 확보할 수 있다는 점에서 유리하다고 생각했다.

가) 다양한 절편체로부터 체세포배 유사구조의 유도

표 9. 치상 절편체와 배지 중의 sucrose, 2,4-D 농도가 체세포배 유도에 미치는 영향

Media		Explants				
Sucrose (%)	2,4-D (mg/l)	Cotyledon	Hypocotyl	Apex	Half-seed	Immature zygote
0	0	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-
3	0	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	+
	2	-	-	-	-	+
	4	-	-	-	-	+
	8	-	-	-	-	+
6	0	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	++++
	2	-	-	-	-	+++
	4	-	-	-	-	++
	8	-	-	-	-	++
9	0	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	+	+++
	2	-	-	-	-	+++
	4	-	-	-	-	+++
	8	-	-	-	-	++
12	0	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	+++
	2	-	-	-	-	+++
	4	-	-	-	-	++
	8	-	-	-	-	+

가락김장 2호의 회복친 계통과 유지친 계통의 하배축, 자엽, 성장점과 온실에서 재배하여 자가수분한지 4주~5주 되는 과실의 종자에서 얻은 미성숙접합자배를 치상한 결과 미성숙접합자배에서만 체세포배 유사구조가 유도되었다(표 9). 이외에도가락김장 2호의 경우에는 종자를 소독한 후 반으로 잘라 치상하였을 경우 그 하배축 부분이나 자엽부분에서 체세포배 유사구조가 발생하였다.

가락김장 2호의 회복친 계통은 6% sucrose 와 1mg/ℓ 2,4-D가 포함된 배지에서 체세포배의 유도가 가장 잘 되었으며, 유지친 계통은 3% sucrose 와 1mg/ℓ 2,4-D가 포함된 배지에서 가장 양호하였다.가락김장 2호의 경우는 9% sucrose와 1mg/ℓ 2,4-D가 포함된 배지에서 그와 같은 구조가 발생하였다.

다른 부분들은 모두 비배발생켈러스가 생겼으며, 이 비배발생켈러스가 많이 생긴 조합은 3% sucrose , 1mg/ℓ 2,4-D 조합과 3% sucrose , 2mg/ℓ 2,4-D 조합이었다(표 9).

나) 미성숙접합자배의 크기에 따른 체세포배 유사구조의 유도

미성숙접합자배를 크기별로 나누어 치상한 경우 4 mm 이상이었을 때 체세포배 유사구조 발생이 증가하고 이 때 2,4-D의 농도는 1 mg/L가 가장

표 10. 치상된 미성숙접합자배의 크기가 체세포배 유사구조의 유도에 미치는 영향

2,4-D (mg/L)	Size of immature zygotic embryo		
	2-3mm	4-5mm	6-7mm
0	-	-	-
0.5	+	++	++
1	+	+++	+++
2	+	++	++
4	-	+	+

<sup>z</sup> -: none; +: low; ++: medium; +++: high

<sup>y</sup> SP243, the restorer of Kalag-Kimjang 2

적합하였다. 미성숙 접합자배의 크기가 4-5 mm인 경우와 6-7 mm인 경우 간에는 체세포배 유사구조 형성에 차이가 없었다.

1 mm 크기의 접합자배는 미숙종자에서 분리할 때 상처를 많이 받고, 기구가 닿은 곳이 갈변하는 등 취급이 매우 어려웠고, 배지에 치상하여도 검게 피사하였다. 접합자배의 크기가 8 mm가 되면 더 이상 길이가 늘지 않고 굵기만 증가하면서 배유조직이 굳어져 배로부터 쉽게 제거할 수 없어 배지에 치상하는 것이 매우 어려웠다. 또한 배지에 치상하더라도 접합자배를 적출하는 과정에서 상처를 입기 때문에, 이러한 상처에서 비배발생 캘러스가 생기거나 갈변부위가 늘어 오히려 체세포배 유사구조의 형성을 억제하였다.

다) Cytokinin의 첨가가 체세포배 유사구조의 형성에 미치는 영향

Cytokinin의 첨가가 체세포배 형성을 촉진한다는 여러 보고에 따라 고추에는 어떤 영향을 미치는지 알기 위하여 BA, coconut water, thidiazuron, zeatin을 각기 저농도와 고농도로 처리하여 보았다.

BA, thidiazuron, zeatin을 2 mg/L의 고농도로 처리하였을 경우, 흰 캘러스가 하배측 발단과 자엽 발단에서 발생하여 비배발생 캘러스가 되었고, 치상된 미성숙 접합자배의 정단부에 초록색의 부정아가 발달하였다(그림 3).

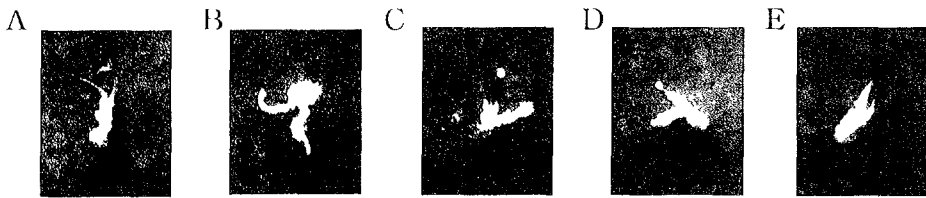


그림 3. Cytokinin 첨가에 따른 체세포배 유사구조의 모양

A: 1 mg/L 2,4-D, B: 1 mg/L 2,4-D + 2 mg/L BA, C: 1 mg/L 2,4-D + 10% coconut water, D: 1 mg/L 2,4-D + 2 mg/L TDZ, E: 1 mg/L 2,4-D + 2 mg/L zeatin

Coconut water를 10%의 고농도로 처리하였을 경우, 2,4-D만을 처리하였을 때와 같이 치상된 미성숙 접합자배의 정단부에서 체세포배 유사구조가 발생하였다(그림 3).

BA, thidiazuron, zeatin을 0.1 mg/L의 저농도로 처리한 경우와 1%의 coconut water를 처리한 경우 모두, 체세포배 유사구조의 형성을 억제하지는 않았으나, 형성된 체세포배 유사구조의 수나 그의 발달에 도움을 주지는 않았고, 미성숙 접합자배의 표면에 흰 켈러스를 발생시켰다(표 11).

Binzel 등 (1996b)은 2 mg/L의 thidiazuron이나 10%의 coconut water를 첨가하여 체세포배의 유도율을 크게 높였다고 하였으나, 본 실험에서 2 mg/L의 thidiazuron은 오히려 체세포배 유사구조의 형성을 억제하였다.

라) Coconut water의 첨가가 체세포배 유사구조의 유도에 미치는 영향

표 11. 고추 미성숙접합자배로부터의 체세포배 유사구조의 형성에 미치는 cytokinin의 영향

Cytokinins	Concentration <sup>y</sup>	somatic embryo-like structure formation <sup>x</sup>
BA	0.1	++
	2.0	-
Coconut water	1	+++
	10	+++
TDZ	0.1	++
	2.0	-
Zeatin	0.1	++
	2.0	-
control	0	+++

<sup>z</sup> SP243, the restorer of Kalag-Kimjang 2.

<sup>y</sup> mg/L except coconut water, coconut water concentration is represented by v/v percent concentration.

<sup>x</sup> -: none; +: low; ++: medium; +++: high

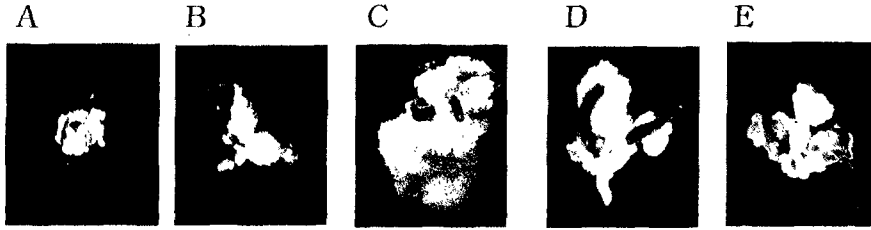


그림 4. Coconut water가 고추의 미성숙접합자배로부터의 체세포배 유사구조의 형성에 미치는 영향  
 A: 1 mg/L 2,4-D, B: 1 mg/L 2,4-D + 5% coconut milk, C: 1 mg/L 2,4-D + 10% coconut milk, D: 1 mg/L 2,4-D + 15% coconut milk, E: 1 mg/L 2,4-D + 20% coconut milk.

Coconut water는 10%의 고농도로 처리하였을 경우나 1%의 저농도로 처리하였을 경우 모두에서 체세포배 유사구조의 형성을 촉진하는 것으로 생각되어 이를 0, 5, 10, 15, 20%로 다시 처리하였다.

Coconut water를 첨가하면 유도되는 체세포배 유사구조의 수가 증가하였으며, coconut water를 첨가하지 않았을 때보다 길이가 길어졌고, 빨리 녹색으로 변하였다(그림 5).

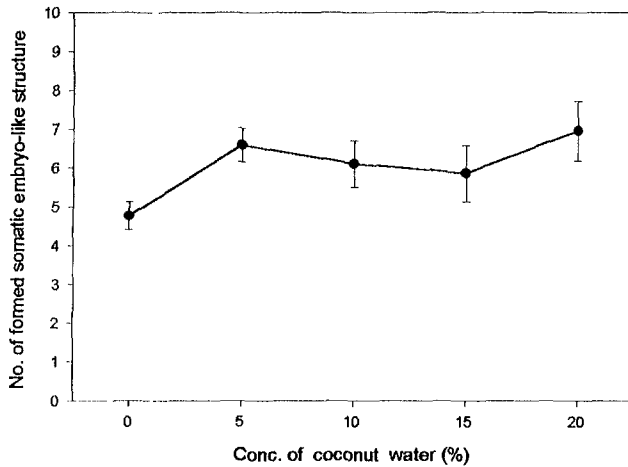


그림 5. Coconut water의 농도가 고추 미성숙접합자배로부터의 체세포배 유사구조의 유도에 미치는 영향



체세포배 유사구조의 수는 coconut water를 5% 첨가하였을 때와 20% 첨가하였을 때에 가장 많았고(그림 4), 녹색으로 변하는 체세포배 유사구조의 비율은 20% 첨가하였을 때가 가장 높았으며, 이 경우에는 체세포배 유사구조가 잎과 비슷한 형태로 발달하는 것도 관찰되었다(그림 4).

이러한 현상은 coconut water의 농도가 높아지면서 2,4-D의 효과를 억제하여, 엽원기에서 탈분화되어 체세포배 유사구조 또는 캘러스로 되었던 조직이 다시 잎으로 재분화된 것으로 생각된다.

마) 식물체의 유전형이 체세포배 유사구조의 형성에 미치는 영향

*Capsicum annuum*인 국내 시판품종 9개와 ‘가락김장 2호’의 유지친, 회북친 계통, 그리고 실험실에서 보유하고 있는 *C. baccatum*과 *C. chinense*에서의 체세포배 유사구조 형성을 보았다. 그 결과 *C. annuum*인 국내 시판품종과 ‘가락김장 2호’의 유지친, 회북친 계통에서 체세포배 유사구조의 형성이 활발하였고, *C. baccatum*과 *C. chinense*에서는 잘 형성되지 않았다(표 12).

국내 시판품종 간에도 체세포배 유사구조의 형성정도가 조금씩 달랐는데, 이로써 미성숙 접합자배로부터 체세포배 유사구조가 형성되는 데에도 유전형의 영향이 있음을 알 수 있었다.

Coconut water는 SP243 계통의 미성숙 접합자배로부터 체세포배 유사구조의 형성을 촉진하는 것으로 판단된 바, 이를 첨가한 배지에 각 계통들을 치상하여 반응을 보았다. 그 결과 대부분의 유전형에서 체세포배 유사구조의 형성을 억제하는 것으로 나타났다(표 7). 특히 ‘봉춘’과 ‘청양’ 품종에서 coconut water에 의해 체세포배 유사구조의 형성이 심하게 억제되었다. 그러나 여러 번의 실험을 통해 SP243 계통에서는 coconut water가 체세포배 유사구조의 형성을 억제하지 않는다는 것을 확인하였는데, 이 계통만이 다른 계통들과 반응을 달리 한다는 것은 특기할 만한 사항이었다.

이는 지금까지의 모든 실험이 SP243 계통을 재료로 하여 수행된 것이므로

로 다른 유전형을 지닌 경우에 반응을 달리한 것으로 사료된다.

표 12. 식물재료의 유전형이 고추 체세포배 유사구조의 형성에 미치는 영향

Variety	Growth regulator		Somatic embryo-like structure formation <sup>x</sup>
	2,4-D <sup>z</sup>	Coconut water <sup>y</sup>	
Kalag-Kimjang 2	+	-	++++
	+	+	+++
SP242 <sup>w</sup>	+	-	+++
	+	+	+
SP243 <sup>v</sup>	+	-	+++
	+	+	+++
Kwangbok	+	-	+++
	+	+	+
Daemyoung	+	-	+++
	+	+	+
Johong	+	-	++
	+	+	+
Cheongyang	+	-	+++
	+	+	+
Kcumtop	+	-	++++
	+	+	+++
Bugang	+	-	+++
	+	+	+
Pungchon	+	-	++++
	+	+	+
Hyangchon	+	-	++++
	+	+	+++
<i>Capsicum baccatum</i>	+	-	+
	+	+	-
<i>Capsicum chinense</i>	+	-	+
	+	+	+

<sup>z</sup> The concentration of added 2,4-D is 1 mg/L.

<sup>y</sup> The concentration of added coconut water is 10% (v/v).

<sup>w</sup> The maintainer of Kalag-Kimjang 2.

<sup>v</sup> The restorer of Kalag-Kimjang 2.

(바) 교질 재료의 종류와 농도가 체세포배 유사구조의 형성에 미치는 영향

교질 재료는 배지 중의 화학적 구성성분의 농도와 이동속도, 그리고 배지의 물리성에 영향을 주어, 치상된 조직의 재분화에 상당한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 그 중에서도 가장 널리 사용되는 agar, gelrite, phytigel을 대상으로 하여 영향을 조사한 결과, agar와 gelrite, 그리고 phytigel 모두 농도를 높여 배지의 경도가 높아질수록 체세포배 유사구조의 신장과 분화를 억제하였는데, 이로써 고추의 미성숙접합자배로부터의 체세포배 유사구조의 형성에는 경도가 높은 구조의 배지보다는 비교적 낮은 구조의 배지가 필요하다는 것을 알 수 있었다. 고추의 미성숙접합자배로부터 체세포배 유사구조를 형성하는 데에는 0.2%의 phytigel이 가장 좋았으며, 0.2% gelrite나 0.6% agar도 좋은 결과를 보여주었다.

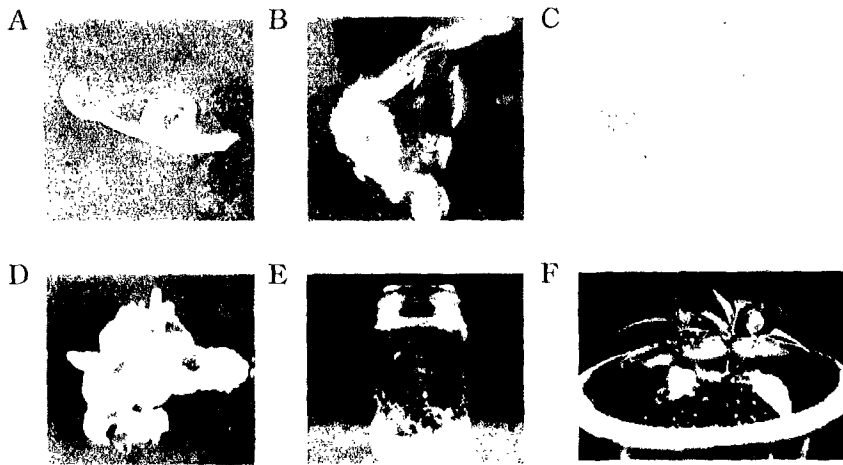


그림 6. 미성숙접합자배에서 유기된 체세포배 유사구조로부터의 식물체 재분화  
 A: 미성숙접합자배 (치상 후 3일) B: 치상 후 10일 C: 치상 후 19 일  
 D: 치상 후 30일 E: 체세포배 유사구조에서 유기된 shoot F: 재분화된 식물체

## 2. 고추의 형질전환 체계 확립

### 가. 연구 재료 및 방법

#### 1) 형질전환용 벡터

본 연구에서 사용한 vector는 pBGOG로서 pCAMBIA3301 vector에 glucose oxidase 유전자를 삽입한 vector로서 bar 유전자와 GUS 유전자가 CaMV promoter로 발현되도록 설계되어 있으며 농업과학기술원에서 분양 받아 이용하였다(그림 7).

#### 2) 고추의 형질전환 체계 확립

고추 종자를 표면소독하여 치상한 지 9-11일 된 유묘로부터 얻은 자엽의 양끝을 엽병이 포함되지 않도록 자르고, 2일간 preculture 배지에서 배양한 후 Kanamycin이 포함된 YEP 배지에서 O.D=0.5가 되도록 키운

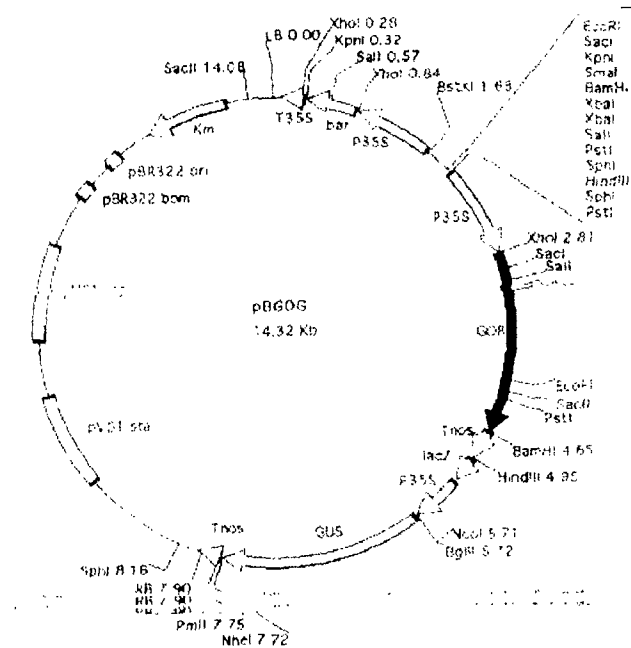


그림 7. 본 연구에 사용된 Ti-plasmid pBGOG

Agrobacterium을 접종하였다. Agrobacterium의 접종은 bacterial solution을 원심분리하여 Agrobacterium을 수거한 후 MS배지에 다시 현탁하여 inoculation solution을 만들고 이에 5분간, 전처리한 자엽을 침지하는 것으로 진행했다. 접종 후 paper blot dry한 자엽을 coculture배지에서 2일간 Agrobacterium과 공동배양하였고, 이후 다시 Agrobacterium을 500 mg/L carbenicillin 용액으로 씻어내고 paper blot dry한 후 shoot induction 배지에서 선발과 함께 형질전환된 shoot를 유도하였다. 이후 shoot elongation 배지에 옮겨 shoot를 신장시킨 후 이것을 다시 root induction 배지에서 뿌리를 유기시켰고 뿌리가 유기되면 소독된 상토와 perlite가 담긴 화분에 옮겨 순화시켰다. 이 과정은 고추의 형질전환 체계를 확립하는데 기본적인 과정이었으며, 각 실험의 목적에 따라 그 구성을 알맞게 조정하였다.

본 연구에서 집중적으로 조정한 부분은 ‘가락김장 2호’의 회복친 계통의 자엽으로부터 shoot를 유도하는 데 적합한 호르몬의 농도, AgNO<sub>3</sub>의 농도, 형질전환 과정 중 preculture 기간, coculture 기간과 coculture 기간 중의 온도, 형질전환체 선발에 적합한 phosphinothricin 농도였으며, 이들을 분석하는 방법은 선발배지에서의 shoot 유도 효율과 GUS 분석을 이용하였다.

이를 통해 세워진 형질전환 체계를 ‘가락김장 2호’, ‘대명’, ‘청양’ 품종과 이들의 유지친과 회복친으로 구성된 9가지 고추 계통에 적용시켜 식물재료의 유전형에 따른 형질전환 효율의 차이를 보았으며, ‘가락김장 2호’, ‘대명’, ‘청양’, ‘CA시교’의 유지친과 회복친을 이 체계에 따라서 형질전환을 수행하고 각각의 계통에서 고추 형질전환체를 획득하였다.

## 나. 연구결과

### 1) Shoot induction에 적합한 호르몬 농도 구명

고추의 재분화 방법 중 가장 형질전환에 적합한 방법은 자엽을 이용한 재분화 체계라고 판단했으며, 이를 형질전환에 직접적으로 이용하려면 먼저 이전에 수행했던 것보다 더 높은 재분화 효율을 나타내어 대량의 재분화 식물체를 얻어야 하였다. 그런데, 같은 호르몬 농도에서도 재분화만을 목적으로 할 때와 형질전환을 수행할 때는 식물 조직의 반응이 달랐기 때문에 형질전환을 목적으로 재분화 체계를 세울 때에는 형질전환 과정 중에서 그 조건을 잡아야 한다고 생각했다.

Shoot induction과정에서 zeatin과 화합성이 높은 호르몬은 NAA보다는 IAA라고 판단되었으며, 따라서 IAA를 auxin계 호르몬으로 정하고, 이를 기준으로 zeatin의 농도를 결정하였다.

'가락김장 2호'의 회복친 계통을 형질전환 대상 계통으로 선정하고 shoot 유도 조건을 구명하였다. 형질전환 과정 중에 '가락김장 2호'의 회복친 계통의 자엽에서 shoot가 가장 많이 유도되는 호르몬 조건은 0.1 mg/L IAA와 2 mg/L zeatin 조합이었다(표 13). 그러나, 이 조합은 반복별로 결과의 편차가 심하여 일상적으로 형질전환을 수행하기에는 오히려 0.1 mg/L IAA와 5 mg/L zeatin을 사용하는 것이 좋다고 판단했다.

표 13. 배지 중 zeatin의 농도가 가락김장 2호의 회복친의 형질전환 시 shoot 형성에 미치는 영향

Conc. of zeatin (mg/L)	Shoot induction (%)	Callus formation	Browning and necrosis	Induction of normal shoots
0	35.4	++	--	*
2	41.5	+	-	***
5	36.9	+	-	**
10	63.1	+	-	*

표 14. AgNO<sub>3</sub>가 가락김장 2호의 회복친의 형질전환시 shoot 유기에 미치는 영향

Conc. of AgNO <sub>3</sub> (mg/L)	Shoot induction (%)	Callus formation	Browning and necrosis	Induction of normal shoots
0	12.3	+++	--	*
5	77	++	-	***
10	79.2	+	-	***

### 2) AgNO<sub>3</sub>의 첨가가 shoot 유도에 미치는 영향

0.1 mg/L IAA와 5.0 mg/L zeatin을 사용하여 shoot를 유기시키고 신장시키는 데에는 AgNO<sub>3</sub>의 영향이 매우 컸다. shoot 유도배지에 AgNO<sub>3</sub>를 첨가하지 않은 경우에는 shoot 유도율이 12.3%에 그쳤으며, shoot 형성에 부정적인 callus가 형성되었다. 또한 여기에서 형성된 shoot는 기형적인 모습이 많았다. 그러나, AgNO<sub>3</sub>를 5 mg/L, 10 mg/L 첨가하였을 때 shoot 유도율이 77%, 79.2%로 향상되었고, callus의 형성도 줄었으며, 정상적인 모양의 shoot가 다량 형성되었다(표 14).

### 3) Preculture 기간이 고추의 형질전환 효율에 미치는 영향

Preculture 기간은 담배 등의 작물에서 알려진 바에 의하면 형질전환 대상 세포의 cell cycle과 관련되어 형질전환 효율에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 전처리 일수를 1일부터 4일까지 일단위로 구분하여 처리한 결과 2일에서 선발배지에서 가장 높은 shoot induction 효율을 보였으며, 이 결과로 전처리 일수는 2일이 가장 효율적인 것으로 판단했다(그림 8).

### 4) Coculture 온도와 기간이 고추의 형질전환 효율에 미치는 영향

Coculture 기간 동안 온도를 낮추어 주면 Agrobacterium의 virulence

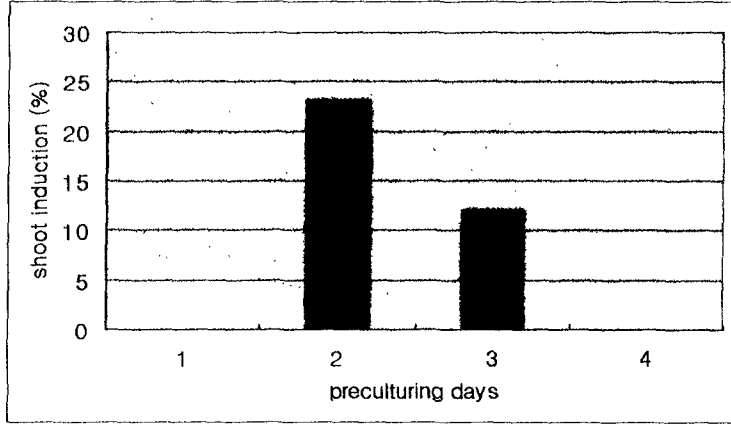


그림 8. 전처리 일수가 고추의 형질전환 효율에 미치는 영향

가 강해져서 형질전환 효율을 높일 수 있다는 보고가 있었다. 따라서, 고추에서도 그런 효과를 얻을 수 있는지 조사하기 위해 coculture 기간 동안 온도와 배양 일수를 달리 해 본 결과 7일 후에 GUS 양성 반응을 보여 유

표 15. 온도와 공동배양 기간이 고추의 형질전환 효율에 미치는 영향

Temperature (°C)	Coculture period (days)	No. of materials	No. of GUS positive explants	Gene transfer frequency (%)
19	1	30	17	57
	2	32	18	56
	3	30	18	60
	4	30	16	53
22	1	28	18	64
	2	30	20	67
	3	30	22	73
	4	30	23	77
25	1	30	17	57
	2	30	19	63
	3	30	18	64
	4	30	21	70
30	1	30	21	70
	2	30	20	67
	3	30	13	43
	4	30	10	33



전자가 전이되었다고 볼 수 있는 개체의 비율이 22°C, 4일에서 가장 높았다(표 15). 그러나, 이 온도에서는 절편체에서 유도되는 shoot의 모양이 25°C에서 유도된 것에 비해 건전하지 않았으며, 실용적으로도 22°C로 온도의 변화를 주는 것보다는 25°C에서 계속 배양하는 것이 대량의 형질전환에 유리하다고 판단하였다. 표 15의 결과에서 보는 바와 같이 22°C, 4일의 결과는 25°C, 4일의 결과로 대체될 수 있었으며, 이를 형질전환 체계 내로 도입하여 이후의 실험을 전개하였다.

25°C에서 coculture를 진행하기 위해 기간을 늘려 실험한 결과, 역시 4일 진행했을 때 gene transfer efficiency가 가장 높았고, 그 이상으로 coculture 기간을 늘렸을 경우에는 Agrobacterium의 번부 등 단점이 많았다(그림 9).

#### 5) 고추 형질전환체 선발에 적합한 phosphinothricin 농도 구명

본 연구에서 형질전환시킬 제초제 저항성 목적 유전자였던 bar 유전자를 선발 마커로서 이용하기 위해 형질전환되지 않은 고추 자엽조직의 phosphinothricin 내성을 조사하였다.

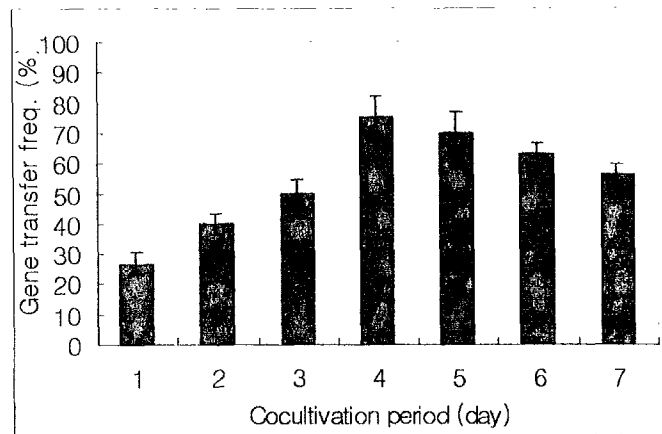


그림 9. 25°C 배양 온도에서 coculture 기간에 따른 유전자 전이 효율

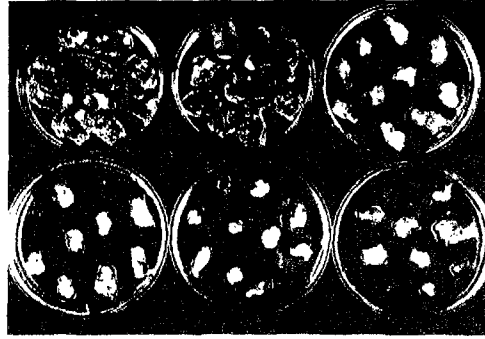


그림 10. '가라김장 2호'의 회복진 계통의 자엽 조직이 phosphinothricin 농도에 대해 나타내는 반응 (왼쪽 위부터 시계방향으로 control, 0.5 mg/L, 1 mg/L, 1.5 mg/L, 2 mg/L, 2.5 mg/L)

표 16에서와 같이 식물재료의 유전형에 따라 약간씩 다른 경향을 보였으나 대체로 750  $\mu\text{g/L}$ 의 phosphinothricin이 첨가되면 대부분의 자엽 절편체가 황화되고 괴사하는 것을 볼 수 있었다(표 16, 그림 10). 따라서 본 형

표 16. 고추 유전형별 치사 phosphinothricin 농도

Genotype	Concentration of phosphinothricin ( $\mu\text{g/L}$ )					
	0	500	750	1000	1500	2000
Cheongyang		■				
Restorer of kalag-kimjang 2.		■	■			
Maintainer of kalag-kimjang 2.		■	■			
Kalag-kimjang 2.		■	■	■	■	■

100%의 자엽이 황화·괴사함

■ 50% 이하의 자엽이 황화·괴사함

질 전환 연구의 초기에는 750  $\mu\text{g/L}$ 의 농도로 선발을 하였으나, 이 경우 shoot의 신장과 이후의 발근 단계에서 생장이 매우 늦어졌고, 따라서 형질 전환체로 선발되는 shoot도 완전한 재분화 식물체로 키워내는 것이 매우 어려웠다.

그래서, 선발효과를 유지하면서도 재분화 효율을 높이기 위해 형질 전환 과정에서 선발에 사용되는 phosphinothricin의 농도를 낮추도록 조정하는 것이 필요했고, 형질전환을 진행하면서 선발배지에 750  $\mu\text{g/L}$ 보다 낮은 농도의 phosphinothricin을 처리하여 shoot induction, necrosis ratio 및 multishoot의 비율을 측정하였다. 그 결과 shoot induction은 500  $\mu\text{g/L}$ 이하에서 높게 나타났고, necrosis는 농도가 높아질수록 증가하는 경향을 보여 700  $\mu\text{g/L}$ 에서는 대부분의 재료가 심하게 피해를 받아 재분화가 어려웠다(그림 11). 그러나, 농도가 낮아질수록 multishoot의 비율도 늘어나 escape의 위험성과 함께 적당한 shoot를 신장시키지 못하는 문제도 나타났다. 쉽게 신장시킬 수 있고 발근도 쉬운, 적당한 크기의 shoot는 500  $\mu\text{g/L}$ 에서 가장 많이 얻을 수 있었고 따라서 500  $\mu\text{g/L}$ 가 선발배지에서의 phosphinothricin의 농도로 적당함을 알 수 있었다(표 17)

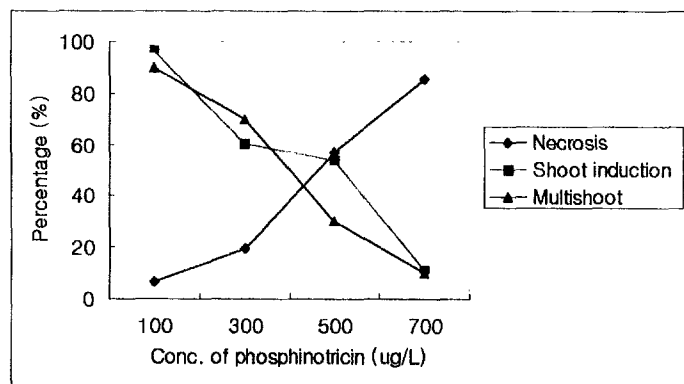


그림 11. Phosphinothricin의 농도에 따른 자엽 절편체의 necrosis, shoot induction, multi-shoot 발생율.

표 17. 선발배지의 phosphinothricin 농도가 고추 자엽 shoot induction과 root induction, gene transfer efficiency에 미치는 영향

Conc. of phosphinothricin ( $\mu\text{g/L}$ )	No. of shoots	No. of shoot rooting	No. of GUS (+) shoots	No. of shoot rooting/No. of shoot (%)	No. of GUS (+) shoots/No. of shoot rooting (%)
100	20	4	1	20	25
300	46	10	2	22	20
500	76	25	11	33	44
700	5	2	1	40	50

### 6) 식물재료의 유전형에 따른 형질전환 효율의 차이

중앙종묘사의 일대교잡종인 ‘청양’, ‘대명’, ‘가락김장 2호’와 이들 각각의 유지친, 회복친 계통에 대해 형질전환을 수행하였다. 세 품종 모두 일대교잡종에서는 비교적 많은 shoot를 얻을 수 있었는데, ‘가락김장 2호’의 경우에는 다른 품종들과는 달리 회복친 계통이 일대교잡종보다 더 많은 shoot를 얻을 수 있었다(그림 12). 또한 대명의 경우에는 회복친 계통이 다른 계통들에 비해 매우 낮은 효율을 나타내고 있는데 이는 매우 흥미로운 결과로서 고추의 형질전환에 있어 식물재료의 유전적 배경이 그 효율에 영향을 미친다고 해석할 수 있다.

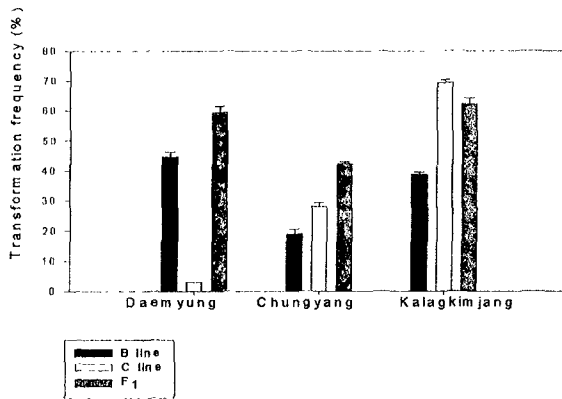


그림 12. 식물재료의 유전형에 따른 형질전환 효율  
B line: 유지친 계통, C line: 회복친 계통

### 7) 효율적인 고추 형질전환 체계의 확립

본 연구에서 진행된 결과를 종합하여 중앙종묘사의 일대교잡종 '가락김장 2호'의 회복친 계통을 효율적으로 형질전환할 수 있는 체계를 확립하였으며, 그 체계는 다음과 같다.

단계	소요시간	배지 조성
식물재료 준비	9-11일	MS + 3% sucrose + 0.8% agar, pH 5.7
Preculture	2일	MS + 3% sucrose + 0.8% agar + 0.1 mg/L IAA + 5mg/L zeatin + 10 mg/L AgNO <sub>3</sub> , pH 5.7
Coculture	3-4일	MS + 3% sucrose + 0.8% agar + 0.1 mg/L IAA + 5mg/L zeatin + 10 mg/L AgNO <sub>3</sub> , pH 5.7
선발 및 shoot 유도	4주	MS + 3% sucrose + 0.8% agar + 0.1 mg/L IAA + 5mg/L zeatin + 10 mg/L AgNO <sub>3</sub> + 500 mg/L carbenicillin + 500 µg/L PPT, pH 5.7
선발 및 shoot 신장	3주	MS + 3% sucrose + 0.8% agar + 5mg/L zeatin + 10 mg/L AgNO <sub>3</sub> + 500 mg/L carbenicillin + 500 µg/L PPT, pH 5.7
발근	2주	MS + 3% sucrose + 0.8% agar + 0.5 mg/L IAA, pH 5.7
순화	1주	Soil

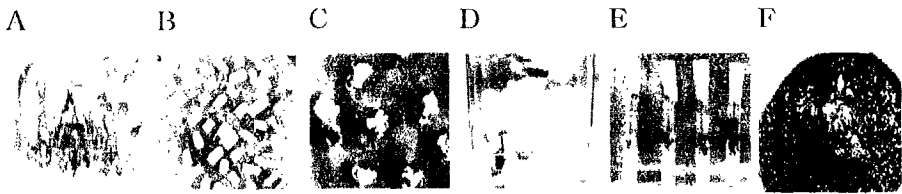


그림 13. 고추 형질전환 단계

A: 식물재료준비 B: 자엽배양 C: shoot 유도 D: shoot 신장 E: 발근  
F: 순화

### 8) 확립된 형질전환 체계를 이용한 고추 형질전환체 획득

앞에서와 같이 확립된 형질전환 체계를 이용하여 “가락김장 2호”의 회복친 계통과 유지친 계통, “청양”의 회복친 계통과 유지친 계통, “CA시교”의 회복친 계통과 유지친 계통, “대명”의 회복친 계통과 유지친 계통에 형질전환한 결과 약 150개체의 형질전환체를 얻었으며, 이들을 분자적으로 검증하고, 후대를 받아 그 이후의 연구를 진행하였다.

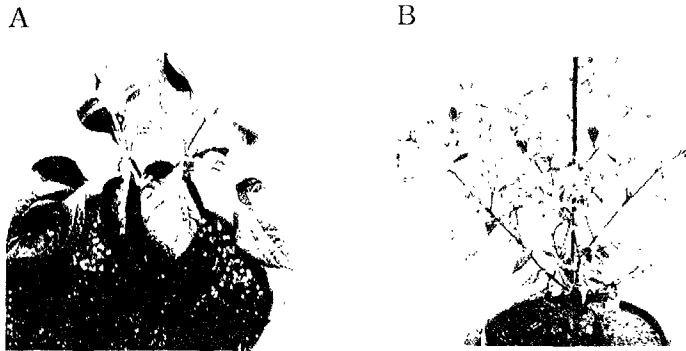


그림 14. 분 형질전환 체계를 이용하여 얻어진 고추 형질전환 식물체

A: ‘가락김장 2호’의 유지친 형질전환체

B: ‘가락김장 2호’의 회복친 형질전환체

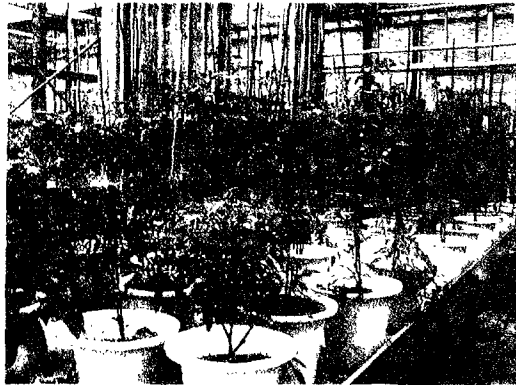


그림 15. 여러 가지 계통의 고추 형질전환체

### 3. 고추의 제초제 저항성 유전자 형질전환

#### 가. 연구재료 및 방법

##### 1) 고추 형질전환체의 PCR 분석 및 PCR-Southern blot analysis

제초제 저항성 유전자가 성공적으로 도입되었는지의 여부를 확인하기 위하여 PCR 분석을 수행하였다.

먼저 DNA를 추출하기 위해 고추의 전개된 잎 1g을 채취하여 2 ml microtube에 넣고 deep freezer (-70℃)에 얼려 액체 질소에 넣고 곱게 갈았다. Extraction buffer (1.4 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 0.5% SDS, 65℃) 1 ml, PVP 0.05 g,  $\beta$ -mercaptoethanol 12.5  $\mu$ l를 넣고 잘 섞어 준 후 65℃에서 1시간 동안 반응시켰고 Chloroform: isoamylalcohol (24:1)을 동량 넣고 40분간 inverting시켰다. 이것을 4℃, 12000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상청액을 따서 1 volume의 isopropyl alcohol이나 2 volume의 Ethanol을 넣고 -20℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 4℃, 12000 rpm에서 5분간 원심분리하여 pellet을 70% Ethanol로 10분씩 두 번 세척하고 spin down시킨 후 pellet을 건조시킨 후 100 $\mu$ l TE buffer나 삼차증류수에 녹였다.

PCR 분석에 이용한 primer는 *bar* gene의 full sequence로부터 제작한 oligonucleotide primer로 sequence는 sense 5'-GCCGCAGGAACCGCAGGAGT-3', antisense 5'-AGCCCGATGACAGCGACCAC-3'이며 PCR 조건은 50 ng DNA, 200  $\mu$ M dNTPs, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 0.1% (v/v) Triton X-100, 0.2  $\mu$ M primer, 1 unit Taq DNA polymerase로 25  $\mu$ l PCR solution을 만들고 94℃에서 5분간 pre-heating한 후, 94℃ 1분, 58℃ 1분, 72℃ 1분 30초로 하여 45 cycle을 반응시켰으며, 이어서 72℃에서 10분간 post-elongation 후 4℃에서 저장하였다. 그 후 여기에서 증폭된 DNA들을 1.0% agarose ethidium bromide gel에 전기영동한 후 ultraviolet하에서 관찰하였다.

PCR-Southern blot analysis는 *Agrobacterium*으로부터 분리한 plasmid DNA에  $^{32}\text{P}$ 로 label한 probe를 PCR product에 hybridization하여 결과를 얻었다.

## 2) 고추 형질전환체들의 GUS 발현 분석

Jefferson 등(1987)에 의한 방법을 기초로 100 mM Tris-NaCl buffer (pH 7.0), 100 mM Ferricyanide, 100 mM X-gluc 의 stock을 각각 만든후 Tris-NaCl buffer 9.6 mL, Ferricyanide stock 0.2 mL, X-gluc stock 0.2 mL로 조제한 reaction buffer 10 ml에 조직을 담가 37°C incubator에서 24 시간 동안 처리하였다. 그 후 조직을 꺼내어 70% ethanol에 1-2시간 침지한 후 광학현미경하에서 조직을 관찰하였다.

### 나. 연구결과

#### 1) 고추 형질전환체의 PCR analysis

T<sub>0</sub> 세대 개체들에 대해 PCR 분석을 해본 결과 7 개체에서 band가 나타나 *bar* 유전자가 도입되었음을 알 수 있었다(그림 16). PCR 분석에서 나

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

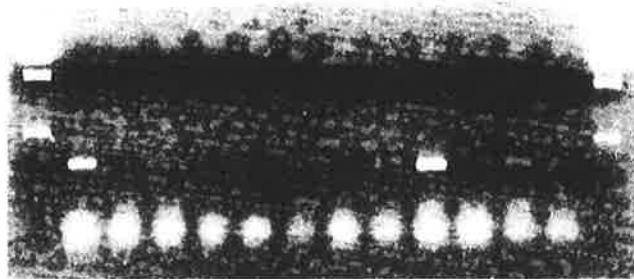


그림 16. *bar* 유전자 primer를 이용한 고추 형질전환체의 PCR 분석 결과

M:  $\lambda$ /HindIII molecular weight marker P: Plasmid DNA extracted from *Agrobacterium* 1: Non-transformed plant 2-11: putative transformants. Arrow indicates 337bp PCR amplified fragment.



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



그림 17. PCR-southern blot analysis 결과

타난 결과를 바탕으로 *bar* 유전자를 probe로 사용하여 PCR-southern blot analysis를 수행한 결과 7 개체에서 모두 양성 반응을 보였다(그림 17).

## 2) 고추 형질전환체들의 GUS 발현 분석

PCR analysis와 PCR-southern blot analysis에서 양성 결과를 나타낸 개체들을 대상으로 GUS 발현을 조사하였다. 이 개체들은 뿌리, 잎, 통도조직, 꽃잎 등에서 GUS 발현이 확인되었으며 꽃잎에서 발현양이 상대적으로 많았다(그림 18).



그림 18. 고추 형질전환체의 잎과 꽃잎에서의 GUS 발현

#### 4. 제초제 저항성 유전자가 형질전환된 고추를 이용한 제초제 저항성 생물검정과 종묘 순도 검정에의 응용

##### 가. 연구 재료 및 방법

###### 1) 제초제 형질전환 개체 선발을 위한 제초제 적정 농도 구명

형질전환하지 않은 '가락김장 2호'의 회복친 계통의 종자를 16공 연결 포트에 상토를 넣은 후 파종하였다. 이것이 10-12 엽기가 되었을 때 제초제를 농도별로 살포하였으며, 2 주 후에 그 피해 정도를 조사하였다.

###### 2) 제초제 살포에 의한 제초제 저항성 생물 검정

T<sub>0</sub> 식물체에서 수확한 T<sub>1</sub> 종자를 16공 연결 포트에 파종한 후 10-12 엽기가 되었을 때 0.05% 바스타 용액을 살포하여 3주 후에 저항성 개체와 감수성 개체를 구별하였다.

###### 3) 제초제 살포로 선발한 저항성 개체의 형질전환에 대한 분자적 검정

제초제 살포로 선발한 개체에 대한 PCR 분석은 제초제 저항성 유전자의 형질전환 여부를 T<sub>0</sub> 개체에 대해 확인할 때와 같은 방법으로 이루어졌는데, 이 때 사용한 primer로는 sense 5'-GGT CTG CAC CAT CGT CAA-3', antisense 5'-TCA GAT CTC GGT GAC GGG CA-3'을 사용하였다.

Genomic DNA에 대한 southern blot analysis를 수행하기 위해 먼저 2 g의 잎조직으로부터 DNAzol™ (Omega biotech, UKB)을 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. 이것을 *Bam*H I으로만 제한하거나 *Bam*H I + *Xho* I 두 가지를 이용하여 제한하였고, 0.8% agarose gel에 전기영동한후 Hybond-Nylon membrane에 이진시켰다. 그 후 이것을 hybridization buffer (5X denhart solution, 6X SSPE, 0.5% SDS, 100 µg/ml salmon sperm DNA)에 넣고 65°C에서 4시간 동안 전배양하였다. 여기에 pBGOG

plasmid를 *Xho* I으로 절단하여 얻은 0.7kb의 DNA절편을  $^{32}\text{P}$ 로 방사선 표식하여 probe로 넣고 65°C에서 18시간 동안 Hybridization을 수행하였다. 이 나일론 막을 2X SSC, 0.1% SDS로 65°C에서 20분 동안 씻은 후 1X SSC, 0.1% SDS로 10분간 세척하고 cassette 안에 두고 2일간 image plate를 노출시킨 후 Fujifilm사의 phospho-image analyser인 BAS 2500을 이용하여 상을 얻었다.

#### 4) 형질전환체 조기 선발을 위한 생물 검정 체계 개발

0.05% 바스타 용액을 처리했을 때 살아남은 개체들을 대상으로 0.1%, 0.2% 농도의 바스타 용액을 농도별로 개체마다 세 잎씩 각각 살포하였다. 대조군으로서는 같은 단계에 있는 '가락김장 2호'의 회복친 계통의 잎을 사용하였다. 잎의 상태는 사흘에 한번씩 조사하였고, 마지막으로 저항성과 감수성을 판정한 것은 살포 후 2주였다.

#### 5) 제초제 저항성 형질전환 개체를 이용한 종묘 순도 검정에의 응용

형질전환 개체로부터 획득한  $T_1$  세대의 종자를 128공 연결포트에 과종하였고 이들이 2-3 엽기가 되었을 때 0.05% 바스타 용액을 살포하였다. 저항성과 감수성의 판정은 2주 후에 하였고, 이를 통해 종묘 순도 검정에의 이용 가능성을 타진하였다.

#### 6) 제초제 저항성 생물 검정을 이용한 형질전환체 후대 선발

약 70 개체의 형질전환체로부터 획득한  $T_1$  세대의 종자 중 약 5000립을 128공 연결포트에 과종하였고 이들이 3-4 엽기가 되었을 때 0.05% 바스타 용액을 권장량만큼 살포하였다. 2주 후 생장점이 고사하지 않은 개체들을 선발하여 지름 10 cm의 화분으로 옮겨 주었다. 이렇게 해서 살아남은 개체의 수를 조사하였다.

## 나. 연구결과

### 1) 저항성 개체선발을 위한 제초제 적정농도 구명

제초제 저항성 개체의 선발을 위한 기준농도를 정하기 위해 '가락김장 2호'의 회복친 계통에 여러 가지 농도의 바스타 제초제 용액을 살포한 후 양상을 비교하였다. 고추의 경우 비교적 낮은 농도인 0.01%에서도 피해를 입었으며 유전형에 따라 반응 정도에 차이는 있었지만 0.05% 이상의 농도에서는 완전히 고사하는 심한 피해를 입었다(그림 19). 바스타의 살포 권장 농도는 0.3%이지만 고추의 경우에는 0.05%만으로 충분한 것으로 나타났고 국내에 많이 분포하는 잡초인 명아주에 0.05%의 바스타 용액을 살포하였을 때, 고추와 같이 고사하였다. 따라서 0.05%의 바스타 용액은 고추와 명아주에 충분한 제초 효과를 보인다고 생각하며, 이 농도의 제초제에 대해 저항성을 가지는 것은 곧 glyphosate계열 제초제에 대한 저항성을 보이는 것으로 해석하여 0.05%를 고추에 있어서 제초제 저항성을 판별하는 기준 농도로 정했다.

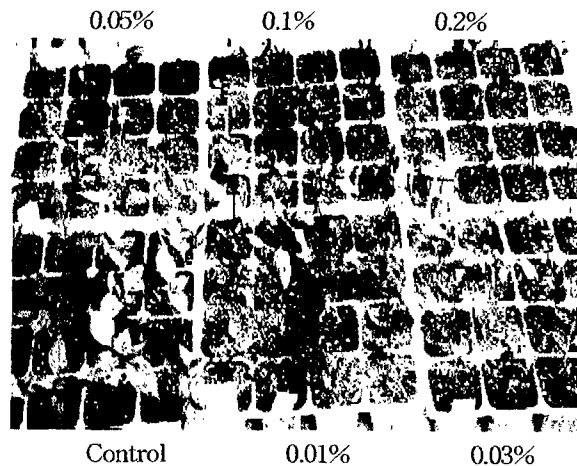


그림 19. 살포한 제초제 용액의 농도에 따른 '가락김장 2호'의 회복친 계통의 반응

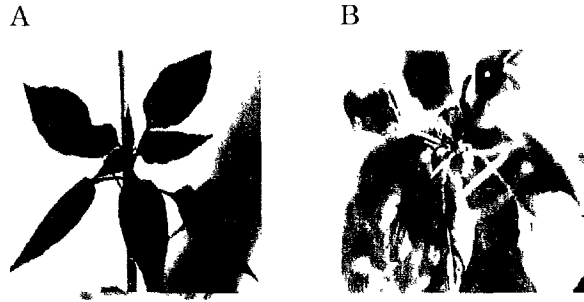


그림 20. 0.05% 바스타 용액 처리에 대한 저항성 반응과 감수성 반응  
(제초제 처리 5일 후)

## 2) 제초제 살포에 의한 제초제 저항성 생물 검정

0.05% 바스타 용액을 살포하여 생물 검정한 결과 PCR에서 음성 반응을 보인 개체의 후대는 모두 제초제에 피해를 입은 반면, PCR에서 양성 반응을 보인 개체의 후대에 있어서는 제초제에 저항성 반응을 보인 개체와 감수성 반응을 보인 개체의 비율이 3:5로 분리되었다. 분리비가 이처럼 나타난 것은 어떤 원인에 의해 도입된 유전자의 발현이 완전하지 못했기 때문으로 사료되며, 이러한 원인에 대해서는 앞으로 연구가 진행되어야 할 것으로 생각한다.

제초제에 저항성을 나타낸 개체와 민감한 반응을 나타낸 개체의 잎을 비교해 보면 저항성 개체의 잎은 제초제를 처리하여도 색깔이나 모양에 변화가 없었던 반면, 민감한 반응을 나타내는 개체의 잎은 제초제를 처리한 날로부터 이틀이 지나면서 잎이 연녹색으로 변색되고 가장자리부분이 갈색으로 타면서 바깥쪽으로 말리거나 조직이 흐물흐물해지면서 2주 후에는 완전히 고사하였다(그림 20).

T<sub>1</sub> 세대에 대한 제초제 저항성 형질전환체의 선발은 0.05% 바스타 용액을 식물체 전체에 살포함으로써 수행하였다. 제초제 살포 3주 후에 피해를 입지 않은 저항성 개체들을 선발하였고, 이것을 다른 분에 옮겨 계속

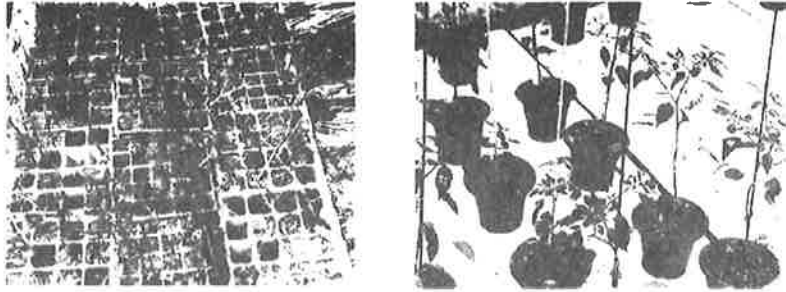


그림 21. 제초제 살포에 의한 T<sub>1</sub> 세대에서의 제초제 저항성 형질전환체 선발  
 왼쪽: 제초제 살포 3주 후 감수성 개체가 고사한 모습  
 오른쪽: 제초제 살포 후 선발된 저항성 개체

재배하였다(그림 21).

### 3) 제초제 살포로 선발한 저항성 개체의 형질전환에 대한 분자적 검정

제초제 직접 처리로 생물검정을 실시한 후 살아남은 개체들에 대해 분자적 검정을 위해 PCR 분석을 실시하였다. PCR 조건은 T<sub>0</sub>에서와 같은 조건으로 실시하였고, T<sub>1</sub> 세대에서도 *bar* gene의 도입을 확인할 수 있었다(그림 22).

T<sub>0</sub> 세대 중에서 PCR 양성 결과를 보인 3 개체와 이들의 후대 중 제초제 생물검정에서 살아남고 PCR에서도 양성 결과를 보인 T<sub>1</sub> 세대 4 개체를 대상으로 genomic southern blot analysis를 수행하였다.

M P N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19



그림 22. *bar* 유전자 primer를 이용한 고추 형질전환체의 PCR 분석 결과  
 M:  $\lambda$ /HindIII molecular weight marker P: Plasmid DNA extracted from *Agrobacterium* 1: Non-transformed plant 2-11: putative transformants. Arrow indicates 337bp PCR amplified fragment.

현재까지 고추의 형질전환에서의 genomic southern blot analysis에 대한 보고는 2건 (Zhu et al., 1996. ; Manoharan et al., 1998)에 불과하다. 이처럼 고추에서 genomic southern blot analysis가 어려운 이유는 분명하지 않다.

그 결과 T<sub>1</sub> 개체에서 희미하지만 band를 볼 수 있었고, T<sub>0</sub>의 경우 한 개체에서는 2개의 band가 보였고 다른 한 개체는 1개의 band를 볼 수 있었다(그림 23). 형질전환되지 않은 식물체에서는 어떤 band도 나타나지 않았다. 그러나, 도입 유전자의 band가 매우 희미한 양상을 나타내어 해석이 쉽지 않으며, 이 부분에 대해서는 앞으로 더 많은 연구를 진행하여, 고추에서도 확실한 밴드가 보이는 southern 조건의 확립이 필요하다.

#### 4) 형질전환체 조기 선별을 위한 생물 검정 체계 개발

대량의 형질전환을 수행할 때, 재분화되는 개체들이 실제로 형질전환된 개체들인지의 여부를 조기에 간편히 검정하는 것은 필수적인 부분이다. 또한, 이 과정에 생물 검정을 이용하는 것은 실제로 도입된 유전자의 발현

		T <sub>1</sub>						T <sub>0</sub>							
M	5X3X1X	C	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	M



그림 23. 고추 형질전환체의 southern blot analysis 결과

M:  $\lambda$ /Hind III molecular marker. P: plasmid DNA extracted from *Agrobacterium* C: Untransformed DNA digested with *Bam*HI  
 1: Transgenic DNA digested with *Bam*HI 2: Transgenic DNA digested with *Bam*HI and *Xho*I.

0.2% 제초제가 처리된  
형질전환체의 잎



0.2% 제초제가 처리된  
비형질전환체의 잎



제초제가 처리되지 않은  
비형질전환체의 잎



그림 24. 단일 잎에 제초제를 처리할 때 형질전환체의 잎과 비형질전환체의 잎이 보이는 반응

을 기준으로 선발한다는 측면에서도 필요한 과정이다.

따라서, PCR과 생물검정을 통해 형질전환되었다고 판단되는 개체들을 이용해 형질전환된 개체들을 간편히 검정할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다. 즉, 제초제 저항성 유전자의 형질전환에서 최종의 목적은 제초제 저항성을 부여하는 것이므로, 재분화되어 나온 개체가 제초제 저항성을 가지고 있는지를 검정할 수 있도록 재분화된 식물체의 잎 몇장에만 제초제를 처리하여 형질전환되었는지 판가름할 수 있게끔 하는 데 목적을 두었다.

형질전환체의 잎에 0.1%, 0.2%의 바스타 용액을 각각 분무하여 그 반응을 조사한 결과 비형질전환체는 민감한 반응을 보이며 말라 떨어지는 반면 형질전환체의 잎은 변화가 없이 모체에 달려있었다(그림 24). 이로 미루어 형질전환체에서 도입유전자의 발현이 이루어지고 있는지의 여부를 몇장의 잎에 0.2% 바스타 용액을 바르는 것으로 알 수 있다고 사료된다.

##### 5) 제초제 살포에 의한 종묘 순도 검정에의 응용 가능성 타진

형질전환체로부터 획득한 종자를 형질전환시키지 않은 종자와 함께 파종한 후 본엽 2매시기에 0.05%의 제초제를 살포하였다. 그 결과 형질전환 개체의 후대들은 살아남은 반면, 비형질전환 개체들은 제초제에 민감한 반응을 나타내었다(그림 25). 이 결과로 보아 고추에 제초제 저항성 유전자를



비형질전환체

형질전환체 후대

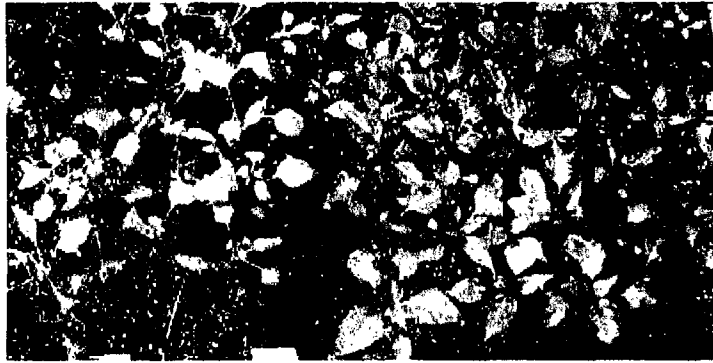


그림 25. 제초제 살포에 대한 비형질전환체와 형질전환체 후대의 반응

형질전환시킨 후 제초제를 살포하면 형질전환개체만을 선발할 수 있는 것으로 해석되며, 따라서 본 연구에서 얻은 형질전환체를 이용해 일대교잡종으로 제초제 저항성 유전자를 도입함으로써 순도 검정을 할 수 있다는 가능성을 확인하였고, 가지과 작물에서 제초제 살포에 의해 진정 일대교잡종묘만을 선발할 수 있다는 가능성도 확인하였다.

#### 6) 제초제 저항성 생물 검정을 이용한 형질전환체 후대 선발

본 연구에서 확립된 고추의 제초제 저항성 생물 검정 방법을 이용하여 형질전환체의 후대에 대해 선발을 실시하였다(그림 26). T<sub>1</sub> 세대 및 T<sub>2</sub> 세

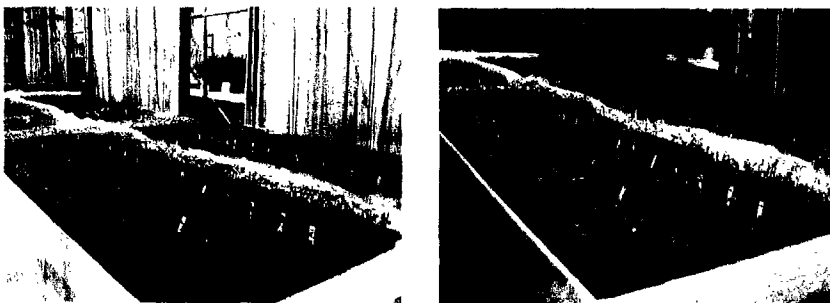


그림 26. T<sub>1</sub> 세대 및 T<sub>2</sub> 세대에 대한 대량 제초제 저항성 생물 검정  
(좌: 제초제 처리 전, 우: 제초제 처리 후 7일)

대의 5000 개체 중에서 살아남은 150개체를 선발하였으며, 이들의 자가수분 후대를 받아 다시 선발을 준비하고 있다.

이들을 T<sub>0</sub> 개체 별로 분석한 그 후대에서의 분리비는 표 18과 같다. 후대에서 예상과는 달리 저항성 개체가 적은 이유에 대해서는 좀 더 연구가 필요하며, 고추에서의 형질전환 유전자의 southern blot analysis가 일상화되는 대로 연구를 진행할 것이다.

표 18. T<sub>0</sub> 개체별 T<sub>1</sub> 세대 재초제 저항성 분리비

T <sub>0</sub> plant	T <sub>1</sub> plants treated (A)	T <sub>1</sub> plants survived (B)	A/B (%)	T <sub>0</sub> plant	T <sub>1</sub> plants treated (A)	T <sub>1</sub> plants survived (B)	A/B (%)
1	105	8	8	28	85	1	1
2	52	1	2	29	29	1	3
3	56	1	2	30	57	3	5
4	61	7	11	31	61	7	11
5	52	1	2	32	51	6	12
6	58	6	5	33	46	5	11
7	64	9	14	34	45	6	13
8	60	23	33	35	17	0	0
9	59	1	2	36	37	6	16
10	40	4	10	37	61	14	23
11	51	1	2	38	30	4	13
12	53	2	4	39	54	4	7
13	59	4	7	40	28	1	4
14	62	6	10	41	63	7	11
15	64	4	6	42	61	9	15
16	32	2	6	43	60	6	10
17	53	5	10	44	55	11	20
18	60	2	3	45	60	32	53
19	62	5	8	46	44	9	20
20	50	5	10	47	44	8	18
21	54	6	11	48	59	11	18
22	59	8	14	49	39	5	13
23	40	3	8	50	50	5	10
24	60	3	5	51	50	2	4
25	63	15	24	52	53	5	10
26	32	3	10	53	51	4	8
27	27	2	7	54	118	14	12

### 제 3 절 연구요약 및 고찰

본 연구는 고추에 제초제 저항성 유전자를 형질전환하여 종묘의 순도를 검정하고 더 나아가 진정 일대잡종 종묘만을 선별함으로써 종묘의 순도를 향상시키는 데 목적을 둔 것으로서 CGMS를 사용하여 채종하는 품종의 회복친에 제초제 저항성 유전자를 안정적으로 발현하도록 형질전환하는 것을 목표로 두었다.

고추는 지금까지 전세계적으로 10편 정도의 형질전환 논문이 발표되었으며, 그 중에서 본 연구에서 대상으로 한 매운 고추에 대한 보고는 이 중 6편에 지나지 않는다. 뿐만 아니라 형질전환 당대가 아닌 후대에서도 발현을 확인한 것은 1편에 지나지 않았는데, 이것은 고추의 형질전환이 매우 어려운 연구 주제임을 보여준다.

고추의 형질전환이 어려운 이유는 여러 가지가 있다.

먼저 고추는 재분화 조건이 까다로워서 일반적으로 많이 쓰이는 호르몬에 대한 감응도가 낮으며, shoot가 유도되어도 신장이 어려워 순화가 가능한 재분화 개체를 얻기가 매우 어렵다. 이러한 결과는 본 연구의 초기에서도 나타났으며, 이것은 고추 형질전환의 큰 고비로 작용하였다.

본 연구에서는 이 문제를 해결하기 위하여 재분화 체계를 자엽 절편체에서의 기관분화를 통한 체계와 half-seed 절편체에서의 기관분화를 통한 체계, 체세포배를 이용한 재분화 체계로 나누어 접근하였다. 그 결과 세 가지 모두에서 재분화 개체를 얻을 수 있었으며, 각각의 방법에 대해 영향을 주는 인자들에 대한 검정도 할 수 있었다. 그러나, half-seed 절편체의 경우는 그 재분화 속도가 너무 빨라 형질전환에 응용하기에는 무리가 있다고 판단하였고, 체세포배를 이용하는 경우에는 당근이나 오이에서와 같이 체세포배발생 켈러스의 유지와 증식을 통한 체세포배 획득이 불가능하고 미성숙접합자배에서 직접 체세포배 유사구조를 얻어야 했기 때문에 형질전환에 소요되는 절편체를 공급받는 데에 제한이 있어 형질전환 수행이 어려웠

다. 따라서, 자엽을 절편체로 이용하는 재분화 체계연구에 집중하였으며, zeatin의 농도를 높이고, shoot의 신장 단계에서  $\text{AgNO}_3$ 를 첨가함으로써 효율적으로 재분화 개체를 얻을 수 있었다.

형질전환 과정에서는 단지 재분화 개체를 얻는 것을 목적으로 할 때와는 달리 *Agrobacterium*의 침입과 carbenicillin의 첨가, selectable agent 등 여러 스트레스 요인 속에서 shoot로 재분화하여야 하기 때문에 재분화 조건도 재분화만을 목적으로 실험하는 것과는 다를 수 있다는 주장이 있었고, 본 연구에서도 같은 양상을 보였다. 따라서, 형질전환을 수행하는 과정에서 재분화 연구를 진행하였으며, 그 결과 형질전환 과정에 직접 응용할 수 있는 체계를 확립하였다.

고추의 형질전환이 어려운 이유 중의 하나는 그 효과가 확연히 드러나는 selectable agent가 없다는 것이다. 본 연구에서는 이 문제를 본 연구에서의 목적 유전자였던 *bar* 유전자를 직접 선발마커로 이용하는 것으로 해결하려 하였다. 따라서 선발 배지에서 살아남는 개체가 곧 목적 형질전환체라고 해석될 수 있었으며, 이들을 많이 얻을 수 있는 조건을 형질전환 최적 조건으로 생각하고 이를 위주로 형질전환 체계를 구성하였다. *bar* 유전자는 기능 자체가 phosphinothricin의 양과 서로 영향을 주고 받기 때문에 형질전환체를 선발할 때에는 적당한 농도의 phosphinothricin을 사용하는 것이 중요하다. 본 연구에서는 형질전환 shoot의 재분화를 어렵게 하지 않으면서도 효과적인 선발을 할 수 있는 phosphinothricin의 농도를  $500 \mu\text{g}/\text{L}$ 로 결정하였다.

고추의 형질전환이 어려운 또 다른 이유는 형질전환되었음을 확인할 검정방법이 확립되어 있지 않다는 것이다. 지금까지 다른 작물에서 형질전환 여부를 결정하는 데 중요한 방법이었던 genomic southern blot analysis는 고추에서는 시도하기 매우 어려운 방법이었다. 그 이유는 고추의 genome size가 다른 작물에 비해 매우 커서 genomic southern을 진행하는 일반적인 방법으로는 결과를 얻기가 어려웠으며, 전반적인 protocol의 개선이 요

구되었다. 이러한 경향은 transgene의 확인에서만 아니라 RFLP 조건을 확립하는 데에서도 나타난다고 하였다. 따라서 genomic southern blot analysis를 통한 고추 형질전환 여부 검정은 고추에 맞는 조건을 확립하는 것이 선행되어야 할 것이며, 이 부분에 대한 연구가 계속 진행되어야 할 것이다.

Total RNA를 이용한 northern blot analysis도 southern blot analysis와 같이 고추에 맞는 조건이 필요하며, western blot analysis의 경우에도 단백질의 purification과 antibody의 특이성을 높여야만 다른 작물에서와 같은 결과를 얻을 수 있었다.

본 연구에서는 이러한 분자적 검정과 함께 제초제 직접 처리를 통한 생물검정으로 세대를 진전하였다. 본 연구에서 고추에 직접 바스타를 처리한 결과 비형질전환체는 0.05% 이상의 농도에서 전혀 살아남지 못하였으며, 따라서 이 농도를 형질전환체 선발 농도로 정하였다. 벼나 양배추 등 다른 작물에서는 0.3%로 형질전환체를 선발하지만 고추가 원래 벼나 양배추에 비해 약해가 심한 작물로 알려져 있고 비형질전환체가 이 농도에서는 생존하지 못하기 때문에 형질전환체 선발농도로서 적합하다고 생각한다.

본 연구에서는 위와 같은 여러 가지 고추 형질전환의 난점에 굴하지 않고 형질전환을 수행하였으며, T<sub>2</sub> 세대까지 진전된 형질전환 후대를 얻었다. 앞으로 이들에 대해 더욱 확실한 분자적 검정 결과와 함께 같은 계통의 비형질전환체와의 여교배를 통해 상용 품종 내로 제초제 저항성 유전자를 도입할 것이며, 이를 통해 본 연구의 최종 목표인 고추 종묘의 순도 향상에 기여할 수 있을 것이라고 사료된다.

# 제 3 장 제초제 저항성 유전자 형질전환을 이 용한 십자화과 작물의 중요 순도 향상법 개발

## 제 1 절 서 설

십자화과 (*Cruciferae*) 작물은 수세기 전부터 식품으로 이용되어 왔으며, 농가에서 재배되기 시작하면서 많은 품종들이 개발되었다. 십자화과 작물 중 우리 나라에서 많이 재배되는 작물에는 배추, 브로콜리, 케일, 양배추, 콜리플라워, 순무 등이 있으며 이들은 모두 *Brassica* 속에 속한다.

배추(*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*)는 중국에서 우리 나라로 전래된 이래 김치의 주재료로 이용되면서 한국에서 가장 중요한 *brassica* 작물 중의 하나가 되었고, 한국뿐만 아니라 중국, 일본과 서아시아국가에서도 김치의 형태로 널리 이용되고 있다. 브로콜리(*Brassica oleracea*)도 *Brassica* 속의 중요한 작물 중의 하나이다. 브로콜리는 주로 화퇴 요리에 이용하고 있으며, 최근 일본, 중국, 대만과 한국 등 아시아 국가에 도입되면서 점점 그 재배면적이 늘고 있다.

유용 유전자를 고등식물체 내로 이전하여 발현시키는 것은 1970년대에 움튼 분자생물학이 발달하여 여러 식물을 대상으로 형질전환을 수행할 수 있게 된 지금 매우 활발히 연구되고 있다. 그 결과 EPSPS 유전자를 이용한 제초제 저항성 품종, Bt toxin 유전자를 이용한 내충성 품종, TMV 외피 유전자 등을 이용한 virus 저항성 품종은 물론, 꽃잎이나 종자의 색깔을 바꾼 품종 등 여러 가지 새로운 형질을 지닌 신품종이 개발된 바 있다.

식물에 외부 유전자를 이전하는 방법 중에는 *Agrobacterium*의 자연적인 감염기작을 이용하여, 식물의 조직단편과 공동배양함으로써 형질전환된 식물체를 얻는 방법이 있는데, 이 방법은 형질전환의 과정이 복잡하지 않고, 식물체의 재분화가 용이하다는 점에서 다른 방법보다 이용성도가 높은

것으로 알려져 있다.

작물은 재배 기간 내내 잡초와 경쟁하며 자라게 되는데 이로 인해 수확량이 감소되며, 작물을 관리하는 데에도 어려움이 따르게 된다. 따라서 현대의 농업은 잡초방제를 위한 수많은 제초제를 개발하였고, 작물의 재배 과정 중 제초제의 사용량이 날로 증가하는 추세에 있다. 따라서 재배 기간 중 제초제 살포로 인한 약해를 방지하고, 밭아 전 제초제의 무분별한 사용으로 야기되는 환경오염을 억제하며, 제초에 소요되는 노동력을 절감하기 위하여 제초제 저항성 유전자를 십자화과 작물에 도입하고자 하는 연구들이 많이 진행되고 있다.

본 연구는 이러한 일반적인 목적 외에, 제초제 저항성 유전자를 십자화과 작물의 일대교잡종 품종의 양친에 도입함으로써 제초제를 살포하였을 때 다른 혼입 종묘들은 죽고 진정한 일대 교잡 종묘들은 살아남도록 하여 십자화과 작물의 종묘 순도를 적극적으로 향상시킬 수 있도록 하는 데 주목적을 두었다. 또한 이것은 궁극적으로 우리나라 종묘산업과 십자화과 채소 산업의 국제경쟁력을 제고시킬 수 있는 방법이기도 하다.

본 연구에서는 십자화과 작물의 재분화 체계를 확립하고 이를 기반으로 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환을 수행함으로써 유용 유전자를 식물체 내에 도입하는 효율적인 형질전환방법을 확립하였고, 이로부터 얻어진 제초제 저항성 식물체에 대해 분자적 검정과 생물검정을 수행하여 후대에서도 안정적이면서 강력하게 발현하는 제초제 저항성 식물체를 확보하였다.

## 제 2 절 재분화 체계 확립

식물의 재분화는 작물별로 다양한 절편체에서 이루어진다. 그러나, 조직배양에 있어 절편체로부터 기관이 재분화되는 효율은 재료로 어떤 절편체를 사용하느냐에 따라 크게 달라진다. 식물체를 구성하고 있는 모든 세포는 전형성능을 지니고 있지만, 그것이 표현되는 세포는 특정 세포에 국

한되어 있다. 그러므로, 전형성능을 표현할 수 있는 세포로 구성된 절편체를 배양하는 것이 기관형성에 유리하다. 그리고, 인위적으로 조절되는 환경 내에서 식물체를 재분화시킬 때에는 식물생장조절제를 처리하게 되는데, 이 때 모식물체의 유전조성, 성장조건 및 절편체 채취시기, 부위 등이 절편체의 내생 호르몬에 영향을 주므로, 이들 인자들을 고려하여 처리 농도를 다르게 하는 것이 일반적이다. 식물생장조절제인 auxin, cytokinin, abscisic acid, ethylene 등은 이들 간의 상호작용에 의해 그 효과가 촉진 또는 억제되는데, shoot의 분화에는 auxin과 cytokinin의 상호작용이 가장 중요하다고 보고되었다. 조직배양 과정에서 auxin은 callus의 유기를 촉진하고, 엽록체 형성을 억제하며, 뿌리, shoot 및 배의 발생을 촉진하는 역할을 한다. Cytokinin은 세포분열을 촉진하고, 직접 또는 간접적으로 shoot와 axillary shoot의 유기를 촉진하며, 뿌리의 형성을 억제한다. 본 실험에서는 이와 같은 auxin과 cytokinin 등의 성장조절제를 조정하여 십자화과 작물의 효율적인 재분화 체계를 확립하고자 하였다.

## 1. 식물재료 수집 및 종자소득

Table 1. list of plant materials in *Brassica* species

Species	Common name	Breeding lines
<i>B. campestris</i>		'Seoul'(F <sub>1</sub> hybrid)
ssp. <i>pekinensis</i>	Chinese cabbage	'Yellow spring'(F <sub>1</sub> hybrid) KW 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 KW 23, 24, 26
<i>B. oleracea</i>		KW3-1
var. <i>italica</i>	Broccoli	KW 11,12,13,27,53,54,59,60
var. <i>capitata</i>	Cabbage	KW 14,15,28
var. <i>acephala</i>	Kale	KW 16



표 1에 나타난 바와 같이 십자화과 작물의 육종 계통 및 유용유전 자원을 중앙 종묘에서 분양받아 식물재료로 사용하였다. 종자소독은 70% EtOH에 5분 동안 침지하여 1차 표면소독한 후, 멸균수로 3회 세척하고, 40% 락스에 10분간 소독한 다음, 다시 멸균수로 3회 세척하는 과정으로 진행하였다. 소독된 종자를 멸균 처리된 고체 발아배지(1/2 Murashige & Skoog medium, 1% sucrose, 0.7% Agar, pH 5.6-5.8)에 파종하고 암상태에서 1일 동안 최아시킨 후, 16h light/8h dark, 22±1℃ 조건의 배양실로 옮겨 발아시켰다. 발아 4-5일 후 자엽과 하배축을 절단해 실험재료로 사용하였으며, 성장점부위는 기본배지(Murashige & Skoog salt, 2% sucrose, 0.7% Agar, pH 5.6-5.8)에 배양하였다. 그리고 식물재료로 이용할 적당한 크기의 본엽과 엽병은 3-4 주 동안 16h light / 8h dark, 500 $\mu\text{mol}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 22±1℃ 조건에서 배양한 식물체에서 채취하였다.

## 2. 절편체 및 재분화 기본배지

서늘품종과 brassica 계통들은 파종한 지 5-6일 된 자엽과 하배축 부위를 1 cm 정도 크기로 잘라 절편체로 사용하였으며, 나머지 성장점 부위는 2% sucrose가 포함된 Murahige & Skoog medium에 계대배양하였다. 자엽과 하배축은 성장조절제의 흡수 효과를 높이기 위해 메스를 이용하여 엽맥 2곳에 상처를 내어 실험에 사용하였다. 일반적으로 십자화과 작물을 조직배양할 때에는 우수한 재생능력 때문에 자엽과 하배축을 많이 사용하지만 이 경우 기내에서 파종하여 1번 밖에 채취할 수 없으므로 종자의 지속적인 공급이 없이는 조직배양이 어렵다. 그러나 본엽과 엽병을 절편체로 사용할 경우 지속적으로 식물재료가 공급되므로 조직배양의 효율을 더 높일 수 있다. 따라서, 본 실험에서는 자엽, 하배축과 함께 본엽과 엽병을 이용하여 십자화과 작물의 재분화 체계를 확립하고자 하였다. 재분화과정에서 기본 배지로는 Murahige & Skoog medium, 2% sucrose, 0.8%

Agar, pH 5.6-5.8를 사용하였으며, 한 개의 plastic petridish에 자엽은 10 개씩, 하배측은 13-15 개씩 치상하여 배지 위에서의 공간을 확보하였고, 개별부는 vinyl wrap으로 감아 절편체의 호흡을 방해하지 않도록 한 후, 배양실에서 배양하였다. 그리고, 이 절편체들을 4 주마다 신선한 배지로 옮겨 배양하였다.

### 3. 재분화

#### 가. 서울품종의 재분화

##### 1) 성장조절제를 이용한 재분화체계 확립

*Brassica* 계통의 기본 재분화 체계를 확립하기 위해 '서울' 품종 배추에서의 재분화 조건을 구명하고자 하였다. 식물재료로는 일련의 종자소독 과정을 거쳐 기내에서 파종한 지 4일 된 유묘의 하배측과 자엽을 사용하였다. 가장 효율적인 성장조절제의 농도를 알아보기 위하여 NAA와 BAP의 농도를 조정하였고, 절편체 종류별 - 하배측, 자엽, 본엽 - 로 재분화율을

Table 2. shoot regeneration frequency of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* cv. 'Seoul' as influenced by plant growth regulators and explant types

Treatment(mg/l)	Explnats No.	Shoots No.	Regeneration(%)
Hypocotyl			
NAA 0.5	BAP 2.0	100	17
	BAP 3.0	100	19
	BAP 5.0	110	23
NAA 1.0	BAP 2.0	110	26
	BAP 3.0	110	34
	BAP 5.0	100	22
Cotyledonary petiole			
NAA 0.5	BAP 2.0	90	6
	BAP 3.0	90	11
	BAP 5.0	90	9
NAA 1.0	BAP 2.0	90	5
	BAP 3.0	90	11
	BAP 5.0	90	13

The medium contains 1.0 mg/L AgNO<sub>3</sub>.

비교 조사하였으며, 여기서 확립된 방법을 다른 계통에 적용하여 그 효율을 비교하고자 하였다. '서울' 품종의 경우 하배축이 자엽보다 재분화율이 높았으며, 하배축의 경우 1.0 mg/L NAA 와 3.0 mg/L BAP 의 조합에서 30.9%의 가장 좋은 재분화율을 보였고, 자엽의 경우는 0.5 mg/L NAA 와 3.0 mg/L BAP의 조합에서 21.1%로 가장 좋았다(Table 2, Fig. 1).

## 2) AgNO<sub>3</sub>의 효과

1971년 Larue에 의해 식물의 기내배양과정에서 에틸렌이 배양체의 생육에 영향을 끼친다는 것이 보고된 이후, 식물체에 적용이 가능한 에틸렌의 활성 억제 방법들이 연구되기 시작하였다. 그 결과 Ag<sup>+</sup>이온이 식물체에서 발생하는 에틸렌의 활성억제에 가장 효과적이라는 것이 밝혀졌으며, 에틸렌에 의해 기내 재분화가 억제되는 것으로 생각되는 꽃양배추, 배추, 감

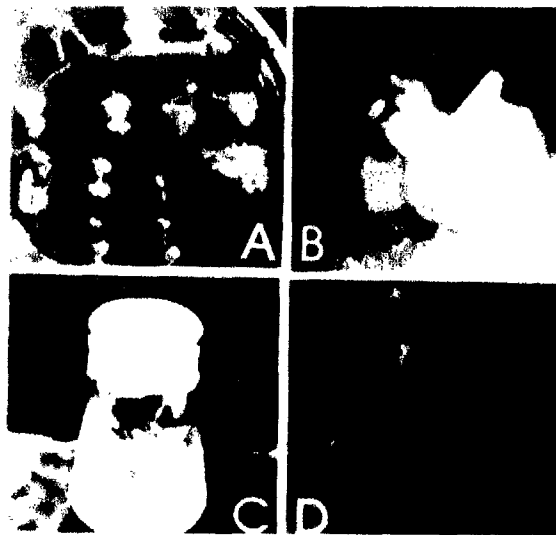


Fig. 1. plant regeneration of chinese cabbage F<sub>1</sub> hybrid 'Seoul'

- A: Shoots and roots induced on explants
- B: Shoot buds under the microscope
- C: Plantlet with well developed roots
- D: Acclimatized plant

자 등의 작물에  $\text{AgNO}_3$ 를 첨가하여 에틸렌의 활성을 억제함으로써 재분화율 및 형질전환율을 향상시킨 사례가 보고되기 시작하였다. 이러한 보고에서 언급된 바에 의하면 에틸렌은 tryptophan이 내성 auxin인 IAA로 전환되는 과정에 관여하여 auxin의 양을 감소시키거나, 체내에서 생성된 auxin의 운반을 억제하는 작용을 한다고 하며, 이를 근거로 본 실험에서도 에틸렌 억제제를 처리함으로써 기내에서의 재분화 효율을 높여보고자 부위별로 0.03, 0.3, 1.0, 2.0, 3.0 mg/L의  $\text{AgNO}_3$ 를 각각 처리하여 관찰하였다.  $\text{AgNO}_3$ 를 3.0 mg/L의 농도로 첨가한 처리구에서는 26.7%,  $\text{AgNO}_3$  1.0 mg/L일 때는 26.0%의 재분화율을 나타냈지만, 전자의 경우에는 비정상적인 식물체의 출현빈도가 높았으며 재분화를 위한  $\text{AgNO}_3$ 의 적정농도는 1.0 mg/L로 추정된다(Table 3, Fig. 2). 자엽의 경우는 0.3 mg/L  $\text{AgNO}_3$ 에서 16.7%의 재분화율을 보였다. 전체적으로 자엽보다는 하배축의 재분화율이 높았다. 이러한 결과를 바탕으로 하배축을 위한 재분화 조건은 1.0 mg/L

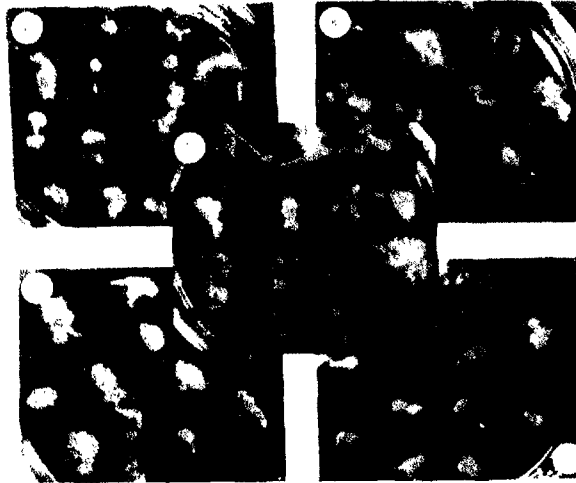


Fig 2. Effect of  $\text{AgNO}_3$  on shoot regeneration of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* cv. 'Seoul'

A: 0.03 mg/L  $\text{AgNO}_3$     B: 0.3 mg/L  $\text{AgNO}_3$     C: 1.0 mg/L  $\text{AgNO}_3$   
 D: 2.0 mg/L  $\text{AgNO}_3$     E: 3.0 mg/L  $\text{AgNO}_3$

Table 3. Effect of AgNO<sub>3</sub> on shoot regeneration of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* cv. 'Seoul'

AgNO <sub>3</sub> Treatment(mg/L)	Explant No.	Regenerated shoots(%)	Vitrified shoots(%)	Normal plant regeneration (%)
Hypocotyl				
0.03	89	3.0	0.0	3.0
0.3	122	7.0	1.0	6.0
1.0	112	26.0	0.0	26.0
2.0	99	23.0	3.0	20.0
3.0	112	26.7	7.1	19.8
Cotyledonary petiole				
0.03	30	0.0	0.0	0.0
0.3	30	16.7	0.0	16.7
1.0	40	15.0	0.0	15.0
2.0	40	15.0	2.5	12.5
3.0	40	15.0	5.0	10.0

Basal medium contains 1.0 mg/L NAA and 3.0 mg/L BAP.

NAA, 3.0 mg/L BAP, 1.0 mg/L AgNO<sub>3</sub>, 자엽은 0.5 mg/L NAA, 3.0 mg/L BAP, 0.3 mg/L AgNO<sub>3</sub>으로 설정하였다.

#### 나. *Brassica campestris*의 재분화

'서울' 품종의 재분화 기초 실험을 토대로 *B. campestris* ssp. *pekinensis*의 재분화 체계를 확립하였다. 배추의 계통에 따른 재분화율의 차이는 현저했으며 전체적으로 배지 II(1.0 mg/L NAA, 3.0 mg/L BAP, 1.0 mg/L AgNO<sub>3</sub>)에서 재분화율이 높았다.

종자를 이용하여 하배축과 자엽을 얻고 이로부터 shoot를 재분화하는 방법은 지속적인 종자의 공급이 필요한 단점이 있어서, 이를 극복하는 방법으로 본엽을 이용한 재분화 실험을 수행하였다. 본엽을 절편체로 이용하면 종자를 파종한 후 성장점만을 계속 계대배양함으로써 식물재료를 지속적으로 공급할 수 있었다. 본엽으로부터의 재분화는 zeatin을 처리한 때에만 일어났으며 NAA의 농도가 큰 영향을 미쳤다. 본엽을 이용한 형질전환

Table 4. Shoot regeneration frequency of Brassica species species as affected by culture medium and genotypes.

Breeding lines	I <sup>z</sup>		II <sup>y</sup>		
	Explnats No.	Shoots (%)	Explants No.	Shoots(%)	
<i>B.campestris</i> <i>ssp.pekinesis</i>  (Chinese cabbage)	KW 1	65	13 (20.0)	74	26 (35.1)
	KW 2	40	9 (22.5)	40	17 (42.5)
	KW 3	40	1 ( 2.5)	31	4 ( 5.0)
	KW 4	10	0 ( 0.0)	7	0 ( 0.0)
	KW 5	10	0 ( 0.0)	10	0 ( 0.0)
	KW 6	38	1 ( 2.6)	38	4 (10.5)
	KW 9	48	17 (35.4)	48	19 (39.6)
	KW 10	20	0 ( 0.0)	30	0 ( 0.0)
	KW 23	33	6 (18.2)	22	5 (22.7)
	KW 24	20	1 ( 5.0)	50	0 ( 0.0)

z NAA 0.5 mg/l + BAP 2.0 mg/l + AgNO<sub>3</sub> 1.0mg/l

y NAA 1.0 mg/l + BAP 3.0 mg/l + AgNO<sub>3</sub> 1.0mg/l

Table 5. Effect of shoot regeneration frequency of leaf explants of *Brassica campestris* ssp. *pekinesis* breeding line KW 26 and KW 10.

Treatment (mg/l)	Regeneration Frequency (%)			
	KW 26		KW10	
	Leaf	Cotyledon	Leaf	Cotyledon
Z 1.0 + B 3.0 + N 1.0	12.5	4.16	18.2	25.0
Z 1.0 + B 3.0 + N 0.5	6.3	0.0	7.5	20.8
Z 2.0 + B 2.0 + N 1.0	31.3	0.0	28.1	18.8
Z 2.0 + B 2.0 + N 0.5	6.3	0.0	18.8	15.6
Z 3.0 + B 1.0 + N 1.0	9.4	4.2	12.5	25.0
Z 3.0 + B 1.0 + N 0.5	0.0	0.0	12.5	8.3

Z: Zeatin B: BAP N: NAA / Each medium contains 0.5 μM AgNO<sub>3</sub>

에는 2.0 mg/L zeatin, 2.0 mg/L BAP, 1.0 mg/L NAA와 0.5  $\mu$ M AgNO<sub>3</sub>을 함유한 조합을 이용하는 것이 효과적일 것으로 생각되었다.

또한 Tobacco suspension cell을 이용한 nurse culture 방법과 cytokinin의 고농도 처리는 재분화율을 향상시켰으며, 공동배양시 절편체 절단면의 갈색화를 방지하였다. Table 6에서 보는 바와 같이 1.0 mg/L NAA, 2.0 mg/L BAP, 2.0 mg/L zeatin, 0.5 mg/L AgNO<sub>3</sub>을 처리한 구

Table 6. Shoot regeneration rate of chinese cabbage as affected by culture media and genotypes.

Genotype	Explant	No. of explants	Shoot (%)	Medium
KW1	Hypocotyl	65	20.0	Type A
	Hypocotyl	74	35.1	Type B
	Hypocotyl	69	54.0	Type C
KW2	Hypocotyl	40	22.5	Type A
	Hypocotyl	40	42.5	Type B
	Hypocotyl	40	2.5	Type A
KW3	Hypocotyl	31	5.0	Type B
	Hypocotyl	80	18.0	Type C
	Hypocotyl	38	2.6	Type A
KW6	Hypocotyl	38	10.5	Type B
	Hypocotyl	34	68.0	Type C
KW7	Cotyledon	60	15.0	Type C
	Hypocotyl	89	33.0	Type C
KW8	Cotyledon	74	35.0	Type C
	Hypocotyl	48	35.4	Type A
KW9	Hypocotyl	48	39.6	Type B
	Hypocotyl	60	42.0	Type C
	Hypocotyl	20	0.0	Type A
KW10	Hypocotyl	30	0.0	Type B
	Cotyledon	40	15.6	Type C

Type A : 0.5 mg/L NAA, 2.0 mg/L BAP, 0.5 mg/L AgNO<sub>3</sub>.

Type B : 1.0 mg/L NAA, 3.0 mg/L BAP, 0.5 mg/L AgNO<sub>3</sub>.

Type C : 1.0 mg/L NAA, 2.0 mg/L BAP, 2.0 mg/L zeatin, 0.5 mg/L AgNO<sub>3</sub>.

Cotyledon : Cotyledonary petiole

Table 7. The improvement of the regeneration ratio of *Brassica campestris* ssp. *perkinensis* by pretreatment of high concentration of cytokinin and auxin

Inbreeding line	Explant	I		II	
		No. of explants	Shoot (%)	No. of explants	Shoot (%)
KW1	H	69	37(54)	70	41(59)
KW3	H	80	14(18)	80	12(15)
KW7	C	60	9(15)	65	15(22)
	H	40	27(68)	85	63(74)
KW8	C	74	26(35)	70	23(33)
	H	89	29(33)	84	28(33)
KW9	H	60	25(42)	75	37(49)

I: pretreated with 10.0 mg/L BAP and 10.0 mg/L NAA for 1 week.

II: pretreated with 10.0 mg/L BAP for 1 week.

C: cotyledon H: hypocotyl

(Type C)에 있어서는 대부분의 유전자형에서 기존의 방법보다 높은 재분화율을 나타내었다.

Cytokinin류를 고농도로 처리하여 재분화율을 향상시키는 데 있어서 문제점이었던 shoot의 rosette화를 Zeatin과 BAP의 혼용으로 극복할 수 있었다(Table 8).

Table 8. The comparison of regeneration ability between treatments of BAP and Zeatin.

Inbred line	Conc. of hormone	Petiole		Leaf		
		No. of explants	Shoot (%)	No. of explant	Shoot (%)	
KW7	Zeatin	10	30	7(23)	86	20(23)
		30	29	6(21)	74	23(31)
		50	48	2(4)	72	37(51)
		100	27	2(7)	73	10(13)
KW9	BAP	10	37	5(14)	85	43(51)



Table 9. Shoot regeneration rate of broccoli as affected by culture medium and genotypes.

Breeding lines	I <sup>z</sup>			II <sup>y</sup>	
	No. of explants	Shoots (%)	No. of explants	Shoots(%)	
<i>B. oleracea</i> KW 11	60	31 (51.7)	70	17 (24.2)	
<i>var. italica</i> KW 12	40	19 (47.5)	50	21 (42.0)	
(Broccoli) KW 13	90	55 (61.1)	80	45 (56.3)	

z 0.5 mg/L NAA + 2.0 mg/L BAP + 1.0mg/L AgNO<sub>3</sub>

y 1.0 mg/L NAA + 3.0 mg/L BAP + 1.0mg/L AgNO<sub>3</sub>

#### 다. *Brassica oleracea* 계통의 재분화

배추에서의 재분화 실험을 토대로 *Brassica oleracea* 계통의 재분화조건을 체계화 하고자 하였다. *B. oleracea* var. *italica* (Broccoli)에서 하배축과 cotylendnary petiole을 절편체로 이용하여 0.5 mg/L NAA + 2.0 mg/L BAP + 1.0 mg/L AgNO<sub>3</sub>를 첨가한 배지에 치상하였을 때 shoot 분화율이 47.5- 61.1%를 보였다(Table 9). 이와는 달리, 본엽과 엽병을 절편

Table 10. Shoot regeneration rate of KW27 as influenced by plant growth regulators.

Treatment (mg/L)		Leaves			Petioles		
NAA	BAP	Explant No.	Shoots No.	Reg. (%)	Explant No.	Shoots No.	Reg. (%)
0.5	0.5	120	19	15.8	100	4	4
	1.0	90	15	16.6	90	2	2.2
	1.5	100	16	16.0	90	1	1.1
	2.0	70	13	8.6	110	1	0.9
1.0	0.5	100	12	12.0	90	10	11.1
	1.0	100	13	13.0	40	5	12.5
	1.5	100	10	10.0	100	4	4.0
	2.0	90	19	21.1	100	5	5.0

체로 이용하였을 경우에는 0.5 mg/L - 1.0 mg/L NAA, 0.5 mg/L - 2.0 mg/L BAP를 변형 처리한 결과 본엽은 1.0 mg/L NAA, 2.0 mg/L BAP로 처리한 조합에서 21%의 shoot 분화율을 나타내었고, 엽병은 본엽보다 다소 낮은 2.2%-12.5%의 shoot 분화율을 나타냈다. 십자화과에 속하는 작물의 기내 재분화 능력은 속한 종에 따라 차이가 있었고, 같은 종 내에서도 유전적 영향을 크게 받았으며, 이들의 재분화율은 절편체의 종류, 배지에 첨가된 식물생장호르몬, 기타 보조 첨가물의 종류와 농도에 따라 달라진다고 정리할 수 있으며, 이는 여타 다른 보고와 일치함을 확인할 수 있었다. Broccoli에 대한 기초 실험 결과, 본엽과 엽병을 절편체로 이용하였을 때 재분화율이 낮은 것으로 나타났으나, 본엽과 엽병은 실용적으로 쓰기에 매우 좋은 재료이므로 이로부터의 재분화율을 향상시키면서, 여러 가지 *Brassica oleracea* 계통(broccoli, cabbage, kale)에 알맞은 재분화조건을 확립하고자 실험을 수행하였다. 각 조합은 1 mg/L NAA, 2 mg/L BAP, 3 mg/L zeatin을 혼합 처리하여 배양 4주 후에 조사하였으며 그 결과는 Table 11과 같다. 브로콜리 계통인 KW 12가 가장 높은 50%의 shoot 분화율을 나타내었는데(Fig 3), 이 계통의 엽병에서는 18%의 shoot 분화율을 보여 상대적으로 본엽이 엽병보다 shoot의 분화율이 높은 것으로 보인다. 따라서, 본 실험에 사용된 성장조절제의 혼합 조합은 본엽에서는 효과적이지만 엽병에서는 그렇지 못한 것으로 해석되었다. 본엽을 절편체로 이용하였을 때 양배추인 KW 28 계통은 2%, 케일인 KW 16 계통에서는 11%의 재분화율을 나타내었고 엽병을 절편체로 이용하였을 때에는 KW 28은 1%, KW 16은 0%의 재분화율을 나타내어 브로콜리보다 낮은 shoot 재분화율을 보였다. 즉 본 실험에서 사용된 성장조절제의 혼합처리가 양배추와 케일에서는 별 효과가 없는 것으로 관찰되었다.

Table 11. The regeneration ratio of *Brassica oleracea*.

Inbreeding Lines	Leaf		Petiole		
	Explants NO.	Shoots (%)	Explants NO.	Shoots (%)	
<b><i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i></b>					
(Broccoli)	KW 11	80	17(21)	100	14(14)
	KW 12	90	45(50)	100	18(18)
	KW 13	70	27(39)	80	12(15)
	KW 27	90	19(21)	100	5 (5)
	KW 53	100	40(40)	80	10(13)
	KW 54	80	24(30)	90	12(13)
	KW 59	100	14(14)	80	9(11)
	KW 60	120	44(37)	70	15(22)
<b><i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i></b>					
(cabbage)	KW 28	90	2 (2)	80	1 (1)
<b><i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i></b>					
(kale)	KW 16	100	11(11)	100	0 (0)

Inoculated medium is MS supplemented with 1 mg/L NAA, 2 mg/L BAP, and 3 mg/L zeatin

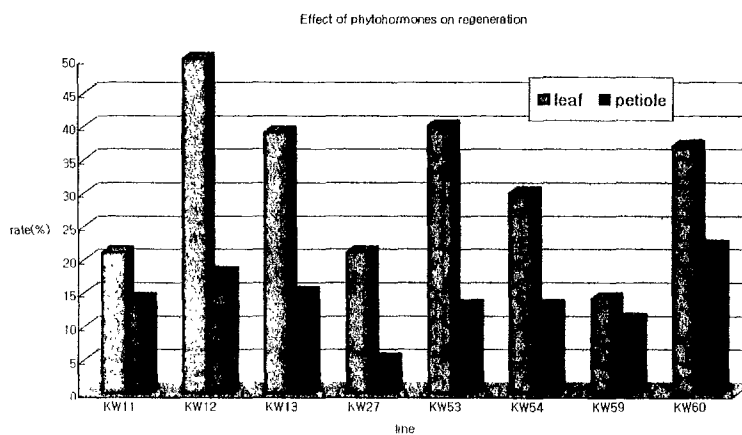


Fig 3. Effect of phytohormones on regeneration of broccoli



Fig. 4. Acclimatization of chinese cabbage

#### 4. 뿌리유도 및 순화

절편체로부터 재분화된 1 cm길이의 shoot들을 0.05 mg/L NAA가 포함된 MS basal medium ( Murashige & Skoog medium, 2% sucrose, 0.8% Agar, pH 5.6-5.8)에 치상하여 뿌리를 유도한 후 지상부를 지탱해 줄 수 있을 정도로 뿌리가 형성된 개체들만 선택하여, 배양병에서 꺼내 뿌리에 묻은 배지를 흐르는 물에 잘 씻은 다음, 원예상토를 넣은 분에 이식하였다. 습윤상태를 유지하기 위해 wrap 또는 polypropylen bag을 사용하여 분을 덮었다. 이는 연약한 기내 식물체가 외부 환경에 잘 적응할 수 있게 하기 위함이었다. 2-3주 정도 후 식물체의 상태에 따라 양호한 것을 비닐 하우스로 옮겨주었다.

### 제 3절 형질전환 체계 확립

형질전환은 외래의 유전자나 세포기관을 다른 세포에 옮겨서 옮겨진 세포에서 발현하도록 유도하는 것이다. 이와 같은 형질전환기법을 이용하면 종래 교잡육종 방법으로는 불가능하였던 새로운 형질의 도입이 가능하

다. 즉, 동물이나 미생물 유래의 유전자가 식물체에서 발현하는 것이 가능한 것이다. 세포에 외래유전자를 주입시키는 방법은 여러 가지가 있으나 이중 생물적인 방법으로 자연상태에서 식물세포에 잘 침입하는 병원성 세균인 *Agrobacterium tumefaciens*를 매개체로 이용하는 것이 가장 널리 이용된다. 즉, *Agrobacterium tumefaciens*는 식물세포에 자신의 유전자를 침투시킬 수 있는 비교적 큰 plasmid를 가지고 있는데, 이것은 식물 세포에 원하는 형질을 도입하려고 할 때 아주 좋은 운반체로 이용된다. 이 plasmid 중에서 실제로 식물 세포에 전이되는 부분은 일부분인데, 이 부분에 원하는 유전자를 제한효소와 ligase를 이용하여 삽입한다. 이렇게 준비된 *Agrobacterium tumefaciens* plasmid를 이용하여 제초제 저항성 유전자를 십자화과 채소로 도입하고자 하였다. 도입된 유전자는 식물체 내에서 안정적으로 발현되어야 하며, 이것이 후대에 안정적으로 유전되는지에 대해서도 확인하여야만 한다. 따라서 형질전환을 수행할 때 필요한 제반 기본조건을 검토하였고, 제초제살포를 통해 유전자의 발현 정도를 조사하였으며 실제 종묘 순도 검정에서의 이용가능성을 입증하고자 하였다.

형질전환 방법으로는 식물체의 형질전환방법 중에서 가장 안정적으로 외부 유전자를 식물체 염색체내로 삽입할 수 있다고 보고된 *Agrobacterium*을 이용하였으며, 증식된 *Agrobacterium*을 질편체(자엽, 하배축, 본엽, 엽병)와 공동배양 하는 방법으로 진행되었다. 그리고, 본 연구팀의 경험을 토대로, 질편체의 전처리 (preculture), *Agrobacterium*과의 공동배양(co-culture) 및 이 과정에서의 acetosyringone의 첨가, 형질전환체 선발(selection)단계에 대해 형질전환 최적 조건을 구명하려 하였으며, 이를 통해 형질전환 식물체를 얻고자 하였다.

# 1. 도입유전자

*Brassica* 계통에 도입된 유전자의 특징은 다음과 같다.

pNB96+Kunnip	잎이나 종자 등을 크게 하는 antisense유전자 (Kunnip)가 pNB96 binary vector에 들어있음
pBPEBR1	Diphtheria toxin 유전자를 이용한 음성 불임 유도
pGA-bar	제초제 저항성 유전자 <i>bar</i>
DTx gene	DTx-A 음성불임 유발 유전자 (독성 유전자)
PAT gene	제초제 저항성 유전자 phosphinothricin acetyl-transferase

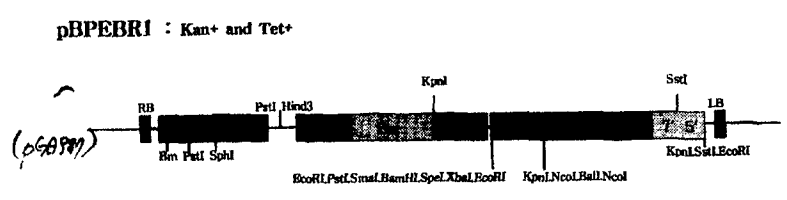
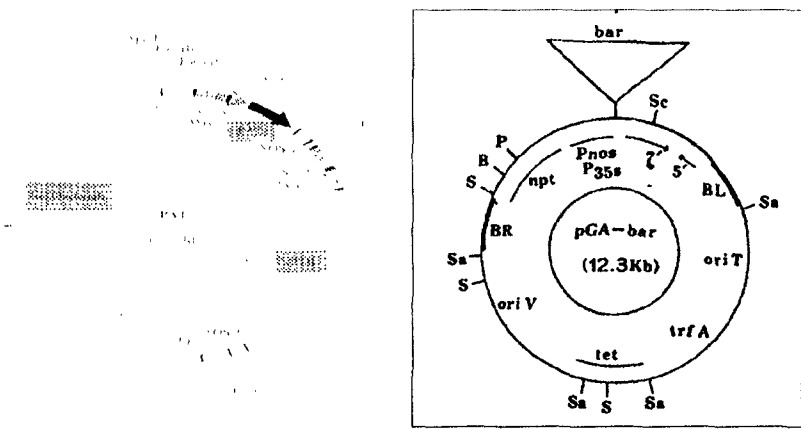


Fig. 5. Map of various genes introduced to *Brassica* lines (PAT, *bar*, DTX-A )

Table 12. Introduction of foreign genes into *Brassica* lines.

종류	계통	목적형질
배추 ( <i>B. campestris</i> ssp. <i>pekinensis</i> )	KW1, 7, 9(순계) 노란봄(F <sub>1</sub> )	응성불임(DTx) 제초제(PAT)
브로콜리 ( <i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> )	KW11,12,13,27 (순계)	제초제( <i>bar</i> )
Chinese Kale ( <i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> )	KW16	제초제( <i>bar</i> )

## 2. *Agrobacterium tumefaciens*를 위한 배양 조건

항생제가 포함된 plate에서 단일 colony를 취하여 YEP 배지 10 ml에 각각 항생제를 첨가한 배지에 접종하고, 이것을 28℃의 shaking incubator에서 200 rpm의 속도로 overnight 배양하였다.

## 3. 항생제 내성 실험

형질전환시 외부 유전자가 삽입된 형질전환체만을 선발해 내기 위한 선발표지를 사용하게 되는데, 여기에는 hygromycin 또는 kanamycin을 가장 많이 사용하고 있다. 그러나, 식물체의 종류와 부위에 따라 항생제에 대한 내성이 다르게 나타날 수 있으므로 각 경우별로 적정 항생제 농도를 결정하여 사용해야 한다. 형질전환을 위한 기초작업으로서 배추와 브로콜리에서 선발에 적합한 항생제의 종류와 농도를 조사하였다.

배추에서는 '서울' 품종을, 브로콜리에서는 KW 11과 13을 재료로 이용하여 시험하였다(Table 12). '서울'과 KW 11의 경우 자엽을 절편체로 사용하였을 경우에는 2.0 mg/L hygromycin이 첨가되었을 때, '서울'의 하배측과 KW13의 자엽과 하배측에서는 5.0 mg/L hygromycin이 첨가되었을 때, KW 11의 하배측을 이용하였을 경우에는 10.0 mg/L hygromycin이 첨가되

Table 13. Resistance level of antibiotics to hypocotyl and cotyledonary petiole explants and genotypes.

Hygromycin (mg/L)	Shooting frequency of 'Seoul' and KW 11 , KW 13 (%)					
	Seoul		KW 11		KW 13	
	H	C	H	C	H	C
0.0	35.9	20.0	60.0	46.7	87.5	33.3
2.0	2.6	0.0	56.0	0.0	37.5	5.5
5.0	0.0	0.0	24.0	0.0	0.0	0.0
10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Kanamycin (mg/L)	Shooting frequency of 'Seoul' (%)					
	H			C		
0.0	21.3			10.0		
5.0	8.8			5.0		
10.0	0.0			0.0		
15.0	0.0			0.0		
20.0	0.0			0.0		

H: hypocotyl C: cotyledonary petiole

있을 때 재분화가 정지되었으므로 이 농도를 선발농도로 설정하였다. Kanamycin의 경우 '서울'의 하배축과 자엽을 대상으로 실험한 결과 모두 10 mg/L의 농도에서 재분화가 되지 않았으므로 이를 선발농도로 설정하였다(Fig. 6).

#### 4. 형질전환과정

형질전환에 이용된 식물재료 중 배추로는 중앙종묘로부터 분양 받은 종자 중 배추 순계 계통인 KW 1과 품종별 비교실험에서 재분화율이 가장 높았던 KW 7, 9, 그리고 일대교잡종인 노랑 봄배추를 이용하였고, *Brassica oleracea* 로는 KW 12, 13, 27을 이용하여 실험을 수행하였다.



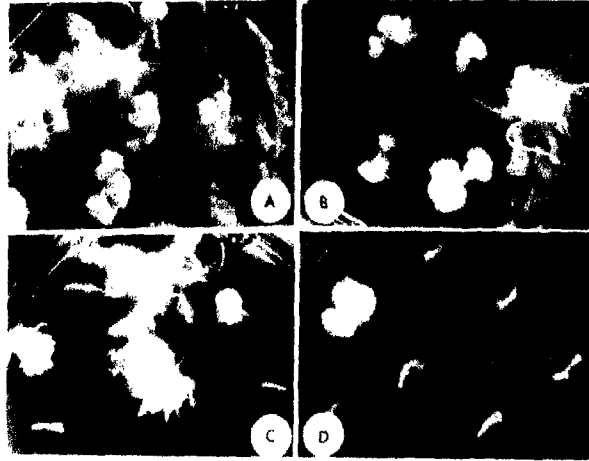


Fig. 6. Resistance level of kanamycin to hypocotyl explants of 'Seoul'  
 A: 0.0 mg/L B: 5.0 mg/L C: 10.0 mg/L D: 15.0 mg/L

#### 가. 전처리 (preculture)

전처리 과정은 모 식물체로부터 절편체를 분리할 때 발생하는 절편체의 상처를 치유하는 과정으로서, 이 과정에서의 생리적인 조건은 이후 절편체의 기내생육에 중요한 영향을 미칠 수 있으므로, 이를 인위적으로 개선해 주어야 할 것으로 생각된다. 따라서 이 과정에서 cytokinin과 auxin 같은 생장조절제를 고농도로 처리를 해주거나, 절편을 고농도의 당용액에 침지하는 과정을 거침으로서 재분화 능력을 높여줄 수 있을 것으로 생각되었다 (Fig. 7). 또한 절편체의 전처리 시간 또한 매우 중요한 것으로 생각되며, 전처리 중의 배지 상태, 즉 전처리배지가 액체배지인지 고체배지인지의 여부에 따라서도 절편체의 기내 생육이 달라질 것으로 예상된다. 또한 전처리의 효과는 배양 식물체의 종에 따라서도 영향을 받는 것으로 보인다. 따라서, 1 cm로 자른 절편체를 엽맥 부위에 메스로 상처를 낸 후, MS 3% 액체 배지 (Murashige and Skoog medium, 3% sucrose, pH 5.6-5.8)에 침지하는 방법과 MS 2% 고체배지 (Murashige and Skoog medium, 2% sucrose, 0.8% Agar, pH 5.6-5.8)에 치상하는 방법으로 하루동안 배양하여

그 효과를 보았다. 액체배지는 오염의 위험성이 고체배지보다 높지만 절편체에 필요한 성분의 흡수가 빠르기 때문에 식물체의 완화에는 효과적이라고 판단했다.

#### 나. 공동배양 (co-culture)

공동배양은 형질전환 과정 중 *Agrobacterium*을 절편체에 접종시키는 과정으로 이 과정의 성패는 세균이 얼마나 활성을 띠느냐, 그리고 어떤 종류의 vector를 포함하고 있는냐에 따라서 좌우된다고 본다. 또한 접종시간이 상당히 중요한데 장시간 접종을 할 경우, 단시간 접종에 비해

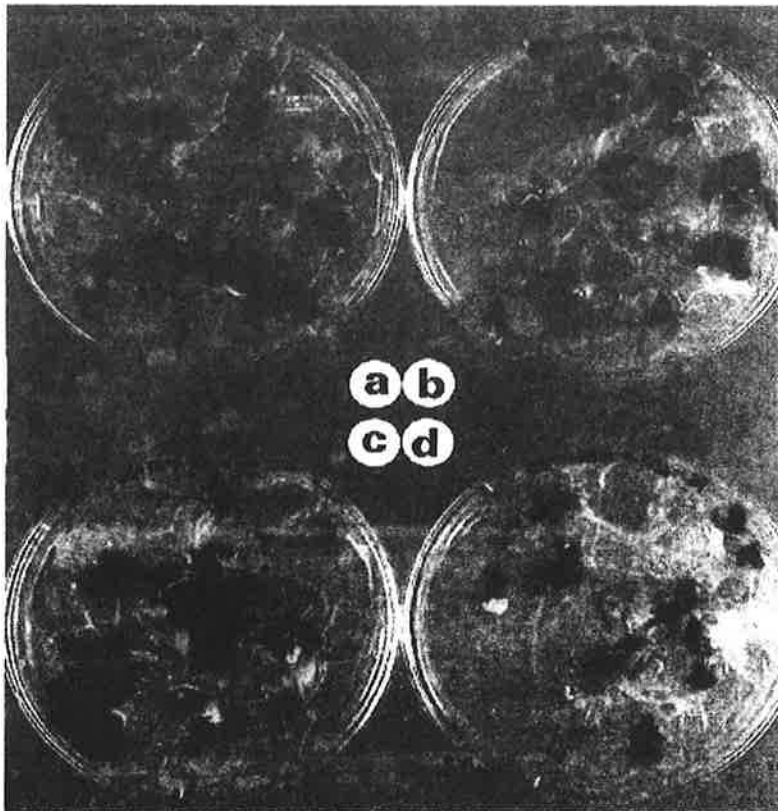


Fig 7. The effect of Cytokinin and Auxin on leaf and petiole of broccoli line, KW27 during preculture  
a,c : 10.0 mg/L BAP    b,d : 10.0 mg/L BAP + 10.0 mg/L NAA

*Agrobacterium*의 감염효율은 높다고 할 수 있으나, 절편체의 생존률에 좋지 않은 영향을 주기 때문에 접종시간의 조절을 해 주어야 할 것으로 생각된다. 접종과정 중에 *Agrobacterium*의 식물체 감염을 돕기 위해 이를 촉진하는 물질을 첨가하는데, 일반적으로 acetosyringone과 같은 phenolic compound를 사용하게 되면 이것이 *vir* gene의 발현을 유도하여 *Agrobacterium*이 자신의 T-DNA를 식물세포 내로 전이하는 것을 촉진시켜주어 형질전환 효율을 높일 수 있다고 알려져 있다. 그 한 예로 *Arabidopsis thaliana*의 형질전환에서는 acetosyringone의 첨가에 의해 형질전환 효율이 2-3%에서 55-63%로 증가하였다고 보고되었다. 물론 이때 절편체의 부위나 식물체의 품종에 따라 acetosyringone의 효과나 적정농도가 다르므로 이를 규명하는 것 또한 중요한 일이라 하겠다.

본 실험에서는 전처리한 절편체를 20 mg/L acetosyringone을 첨가한 배지에 *Agrobacterium*과 함께 치상한 후 1시간 내지 3시간 정도 28℃의 암 상태에서 공동배양하였다. 그 후 filter paper위에서 1시간 내지 5시간정도 건조시켰다. 이 과정은 접종된 절편체에 묻어있는 *Agrobacterium*을 제거함으로써 절편체의 오염을 방지하고자하는 데 목적이 있다.

#### 다. 선발 (selection)

선발과정 중에 선발 marker로 사용되는 항생제의 종류와 농도는 형질전환의 효율에 매우 중대한 영향을 준다. 따라서 항생제 내성에 대한 기초적인 실험을 통하여 적정한 농도의 항생제를 선발배지에 첨가하여 1차적으로 형질전환된 식물체를 선발하였다. 또한 선발과정 중에도 식물체는 계속 재분화하므로, 재분화에 효율적인 식물 호르몬의 종류와 농도를 결정하였다. 그리고 특히 배추와 같이 형태가 rosette인 경우 엽병의 신장을 돕는 물질이 선발배지에 첨가되어야 할 것이므로, 이에 대해서도 재분화 실험 결과를 기초로 삼아 결정하였다. 다음은 이와 같은 방법으로 구성된 선발 배지의 조성이다.

Table 14. Selection medium of chinese cabbage and broccoli

		Chinese cabbage		Broccoli	
Hormones (mg/L)	BAP	2.0	BAP	2.0	
	Zeatin	2.0	Zeatin	3.0	
	NAA	1.0	NAA	1.0	
	AgNO <sub>3</sub>	0.5	AgNO <sub>3</sub>	0.5	
Antibiotics (mg/L)	Cefotaxime	250.0	Cefotaxime	250.0	
	Kanamycin	5.0	Kanamycin	40.0	

### 5. 형질전환체 식물 획득 (T<sub>0</sub> 세대)

제조제 저항성 유전자 및 응성 불임 유전자를 가지고 형질전환을 수행한 결과 Table 15에서 보는 바와 같이 형질전환체를 얻었다. 전체적으로 높은 형질전환율을 보이지는 않았지만, 각 계통별로 1-9개체의 형질전환체를 얻는 데는 성공하였으며, 그 이후 과정에서 잘 자란 형질전환 식물체를 대상으로 목적했던 유전자의 도입 여부를 확인하는 실험을 진행하였다(Fig. 8, 9).

Table 15. Results of transformation experiment of *Brassica* lines.

Brassica line	No. of explants	No. of putative transformants		construct
		leaf	petiole	
KW 11	400/400	0	0	pGA-BAR
KW 12	400/400	1	3	
KW 13	400/400	3	0	
KW 27	400/400	1	0	
yellow-spring	50/60	4	5	pBPE 5
yellow-spring	50/50	3	1	DTX-A
KW 9	100/100	7	5	pBPE 5
KW 9	100/90	4	3	DTX-A
KW 9	200/200	9	3	PAT

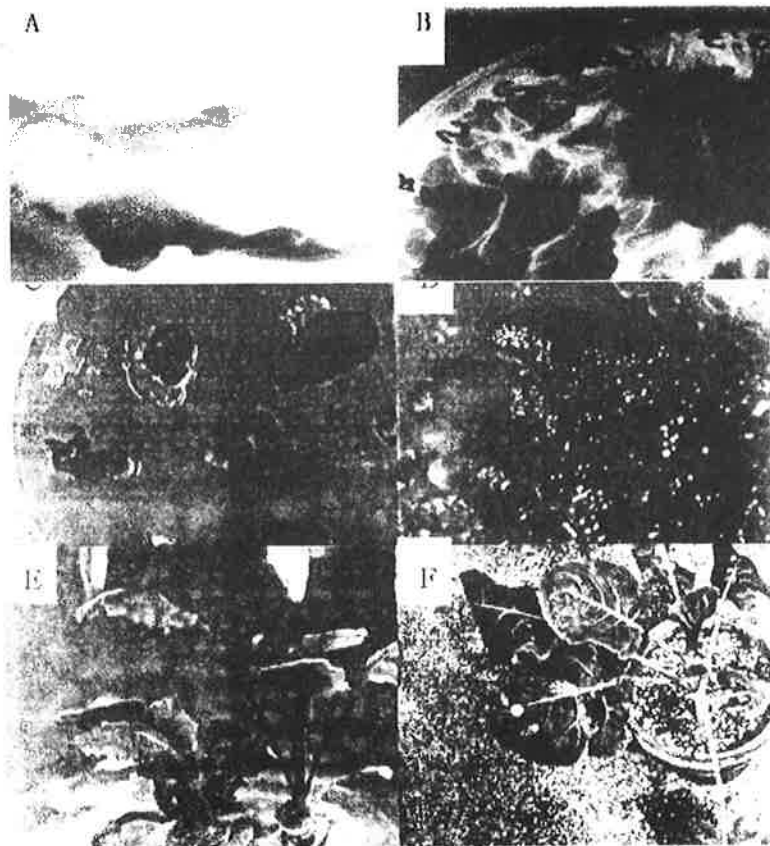


Fig. 8. The production scheme of putative transgenic broccoli plant

A,B,C : shoots induction on the selection medium

D : callus formation on the selection medium

E : rooting of putative transgenic plants

F : acclimatized transgenic plant

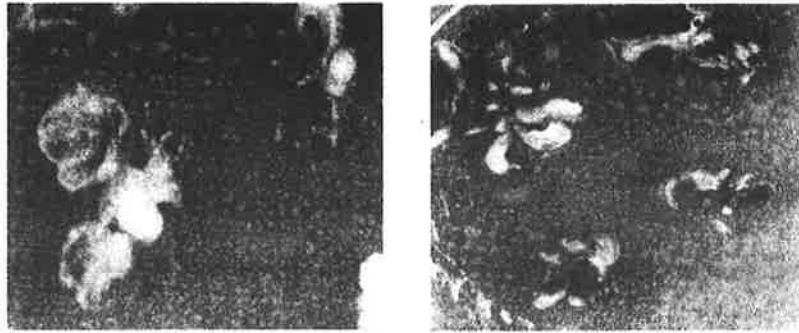


Fig 9. Production of putative transgenic plant (KW9)

## 제 4 절 형질전환체 분석 (T<sub>0</sub> 세대)

PCR과 southern blot analysis를 이용하여 *Agrobacterium*의 T-DNA가 식물체의 genome에 삽입되었는지의 여부를 확인하였다. 또한 northern blot analysis를 이용하여 식물체에 삽입된 유전자가 실제로 발현하고 있는지의 여부도 확인하였다.

### 1. PCR

CTAB 방법을 이용하여 genomic DNA를 추출하였으며, 추출된 total DNA를 0.7% agarose gel에 전기영동하여 DNA양을 확인하였다. 10 ng/2  $\mu$ l의 DNA, 40 pM/2  $\mu$ l primers, 1 unit Dynazyme, 2  $\mu$ l 10X buffer, 11  $\mu$ l 증류수로 총 20  $\mu$ l의 reaction solution을 만들고, 25  $\mu$ l 미네랄 오일을 첨가하였다. 이것을 94 $^{\circ}$ C에서 1분간, 55 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 30초의 조건으로 35 cycle을 실시한 후 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 post-elongation을 시켰다. 그리고 증폭된 DNA는 0.8% agarose gel에 전기영동하여 band를 확인하였다. Specific primer로는 kanamycin 저항성 유전자(NPT II)와

Table 16. specific primer sequence

primer	nucleotide sequence ( 5'- 3')	specific band length(bp)
NPT II	A: GAGGCTATTCGGCTATGACTG	about 700
	B: ATGGGGAGCGGCGATACCGTA	
Bar	A: AACTTCCGTACCGAGCCGCA	about 370
	B: TGAATGCCAGTCCCGTGCT	

제초제 저항성 유전자 (*bar*)에 대한 primer를 사용하였으며, 그 sequence는 table 16과 같다.

PCR 분석결과 NPTII primer에 의한 PCR 증폭산물은 700 bp에서, *bar* primer에 의한 PCR 증폭산물은 370 bp에서 band를 보였으며, 이 결과로 선발된 식물체 내로 원하는 유전자가 성공적으로 도입되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 10, 11).

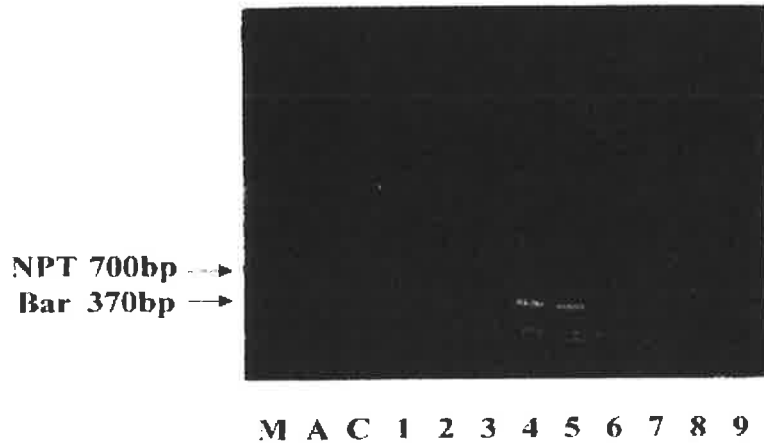


Fig. 10. PCR analysis of putative transformants using NPTII and *bar* primers

Lane 1-2 : KW27 (*Broccoli*), Lane4-9 : KW7 & KW9(*Cabbage*)

1) 10.0 mg/L BAP, 10.0 mg/L NAA 처리

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



2) 20.0mg/L BAP, 10.0 mg/L NAA 처리

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 C B P



Fig. 11. PCR analysis of KW9 putative transgenic plants using NPT II specific primers (700 bp)

B: transgenic broccoli P :positive C: control

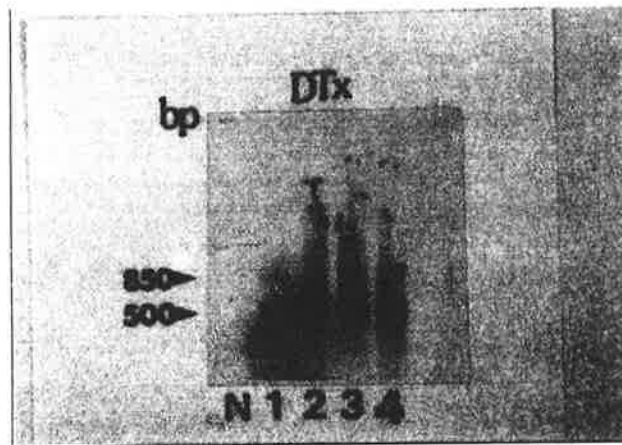
## 2. Southern blotting/ Northern blotting

형질전환 식물체의 genomic DNA를 restriction enzyme을 이용하여 절단하고 NPT II gene을 probe로 사용하여 southern blot analysis를 수행하였다. 배추의 경우에는 웅성불임 유전자(DTX-A), 브로콜리의 경우에는 제초제 저항성 유전자(*bar*)가 식물체 genome안에 안정적으로 삽입되었는지의 여부를 확인하고자 하였으며 그 결과 이들 유전자가 목적 식물체 안에 삽입되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 12). 브로콜리의 경우 *EcoR* I 으로 절단하였을 경우 multigene이 존재함을 확인할 수 있었는데, 비형질전환체의 경우에는 어떠한 밴드도 보이지 않는 반면, 형질전환 식물체의 경우에는 0.75 kbp, 1.6 kbp 그리고 2.0 kbp 이상 등의 여러 가지의 밴드가 나타났다. 따라서 형질전환 식물체 broccoli의 genome내에 안정적으로 *bar*-gene이 삽입되었다고 판단하였다. 형질전환체 식물로부터 RNA를 추출하여 NPT II probe를 이용하여 Northern blot analysis를 수행한 결과 형



질전환체에서는 pNB96+Kunnip 유전자와 DTX 유전자가 전사된 RNA를 확인할 수 있었고, 대조 식물체에서는 밴드가 나타나지 않았다(Fig. 12).

☞ Chinese cabbage



☞ Broccoli

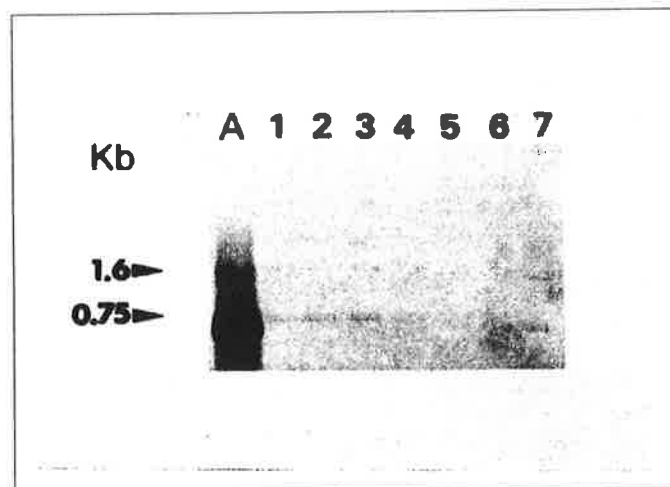


Fig. 12. Southern hybridization using NPT probe

A. Broccoli - pNB 96



B. Chinese Cabbage -DTX 음성불입



Fig. 13. Northern Blotting using NPTII probe

3. 체종

T<sub>0</sub>세대에서의 southern blot analysis와 northern blot analysis 결과 제초제 저항성 유전자(*bar*)가 식물체 genome안에 안정적으로 도입되었음을 확인하였고, 이 형질전환체들을 1-2주 정도 incubator에서 순화시킨 후 화분에 옮겨 심고 비닐하우스 내에서 약 2주간 생육시켜 건강한 식물체로 재배하였으며, 후대의 종자를 얻어 제초제 저항성 유전자가 후대에서도 발현하는지의 여부를 알고자 자가수분하였다. 배추는 T<sub>1</sub>세대 식물체에서 T<sub>2</sub>세대 종자를 얻기 위해 T<sub>1</sub>세대 식물체를 재배하는 중이며, 케일은 T<sub>0</sub>세대에서 T<sub>1</sub>세대 종자를 얻는데 실패하여 지금은 형질전환체가 존재하지 않는다. 브로콜리의 경우에는 T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>세대까지 후대가 유지되고 있다.



Fig. 14. The growth of transgenic chinese cabbage ( $T_1$ )



Fig. 15. Self pollination ( $T_1$ )

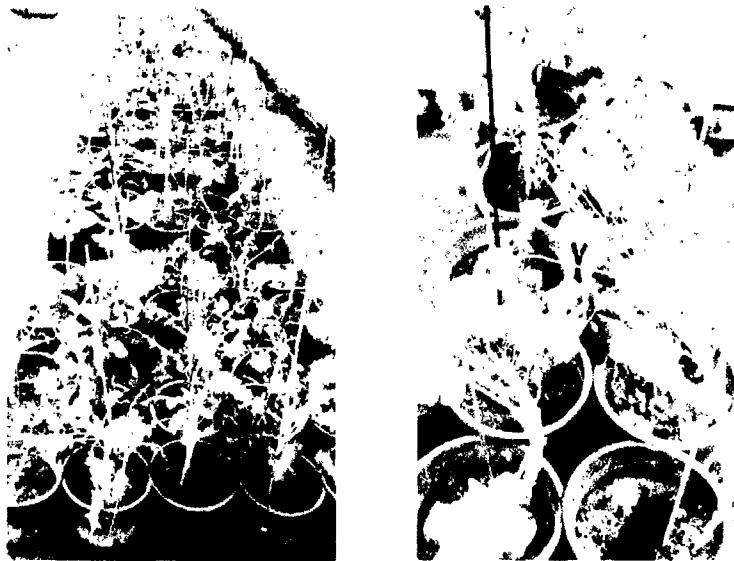
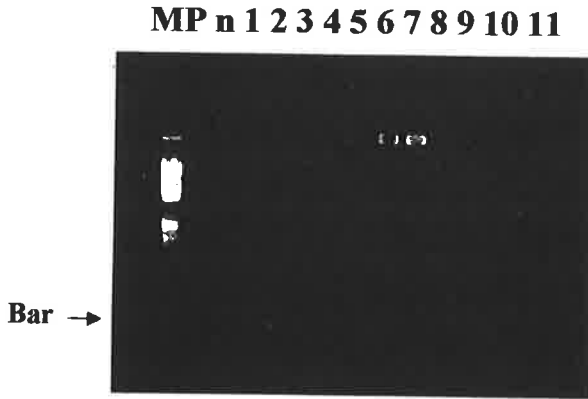


Fig. 16. The growth of putative transformant ( $T_2$ ,  $T_3$ )



**M : marker, P : positive control, n : negative control**

Fig. 17 . PCR analysis of T<sub>1</sub> generation using *bar* specific primers in broccoli.

## 제 5 절 후대 검정

### 1. 분자생물학적 검정

브로콜리의 경우에는 *bar* 유전자가 T<sub>3</sub> 세대까지 안정적으로 유전자가 발현되고 있음을 확인할 수 있었다. 케일의 경우에는 T<sub>0</sub>세대에서 유전자의 삽입이 확인되었고 그 후대를 T<sub>1</sub>세대까지 유지해왔으나 그 이후 세대로의 종자결실을 맺지 못하여 더 이상의 후대에서의 검정이 불가능하게 되었다.

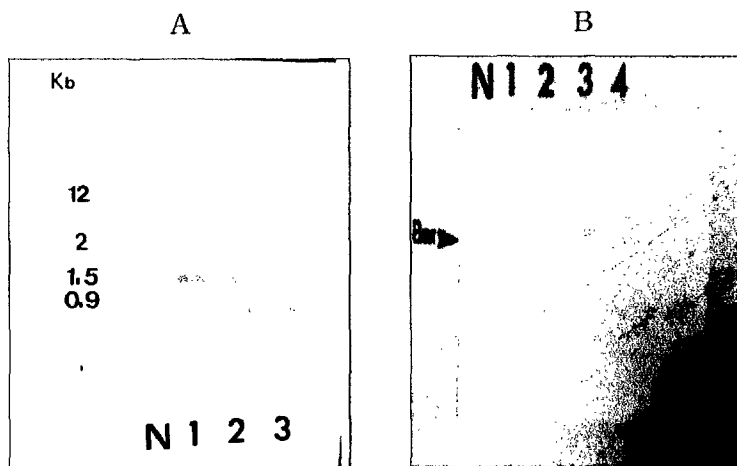


Fig. 18. Molecular analysis of broccoli T<sub>1</sub> generation

A: T<sub>1</sub>세대의 *bar* probe를 이용한 Southern Blotting 결과

B: T<sub>1</sub>세대의 *bar* probe를 이용한 Northern Blotting 결과

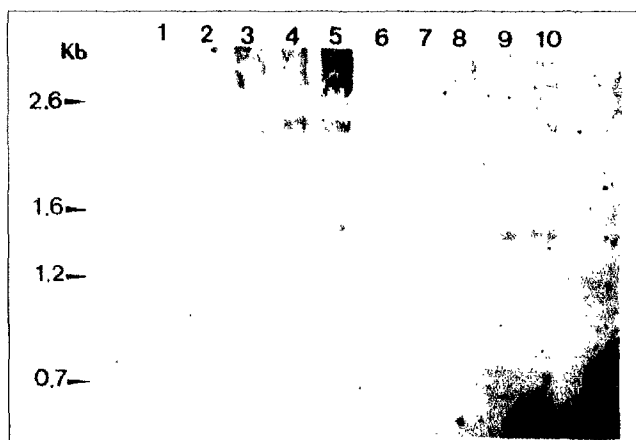


Fig 19. Genomic Southern : Chinese Kale(KW16) - T<sub>1</sub>

m p p c c 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



Fig. 20. PCR analysis ( $T_3$  regeneration) - using bar primers (370 bp)

m : marker p : positive c : control

1-9 : bastar resistant line

10-11 : non-resistant line

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

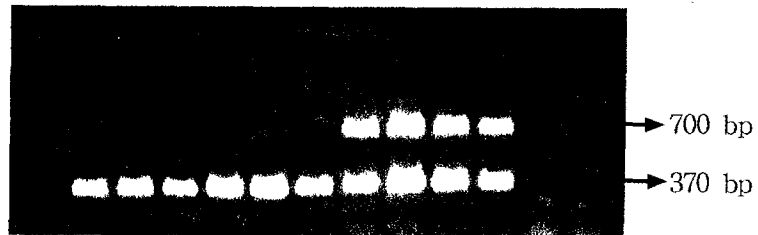


Fig. 21.  $T_3$  generation PCR analysis of transgenic broccoli

a. Using by bar probe

n 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

b. Using by NPT II probe

n 1 2 3 4



Fig. 22. PCR-Southern analysis in broccoli  $T_3$  generation

## 2. 제초제 저항성 검정

일반 농가에서 사용되는 glufosinate계 제초제 중 basta를 0, 500, 1000, 2000, 3000, 5000 ppm의 농도로 대조구와 형질전환체의 잎에 붓으로 발라 주었다. 처리후 5일이 되자 대조구인 일반 broccoli는 500 ppm 농도에서부터 점차 잎이 노랗게 변하여 반점이 군데군데 생기는 등의 약해를 나타내었고 3000 ppm에서는 잎이 떨어져 고사하였다. 그러나 형질전환체의 경우에는 5000 ppm을 처리한 잎에도 아무런 약해가 나타나지 않았다. 따라서 제초제 저항성 유전자가 식물체 안에 안정적으로 도입되어 발현하고 있음이 확인되었다. 3000 ppm의 제초제를 살포하였을 때  $T_1$  세대는 저항성과 감수성이 3:1로 분리함을 확인할 수 있었으며, 배추의 경우에도 3000 ppm으로 처리하였을 때 대조 식물체와 형질전환체를 확연히 구분할 수 있었다 (Fig 24).

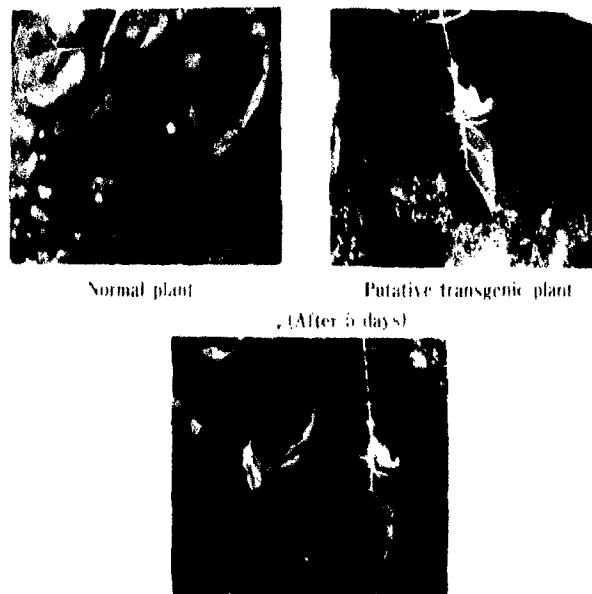


Fig. 23. The difference in herbicide resistance level 5 days after basta treatment on broccoli leaves ( $T_0$ ).

이후 T<sub>2</sub>세대와 T<sub>3</sub>세대에서도중양종묘에 도움을 받아 제초제 저항성 검정을 진행한 결과, Fig. 25, 26에서 보듯이 대조구는 제초제로 인하여 고사되고 형질전환체의 후대는 안정적으로 제초제 저항성을 발현하는 것을 볼 수 있었으며, 따라서 제초제 저항성 유전자가 후대에 안정적으로 유전되고 발현한다는 것을 알 수 있었다.

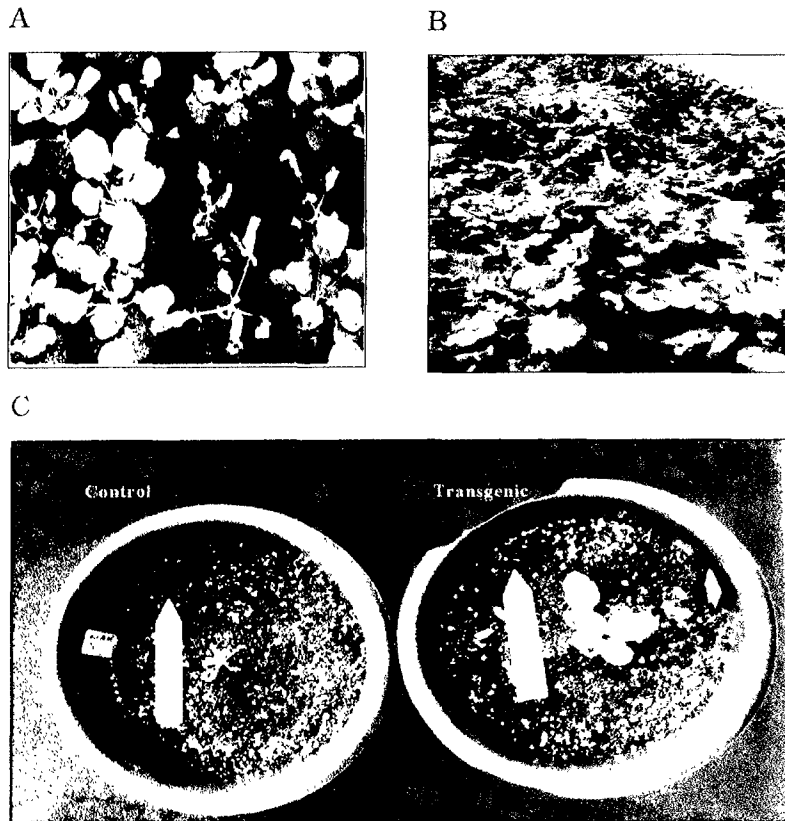


Fig 24. The difference in herbicide resistance after basta treatment  
 A. T<sub>1</sub> generation Broccoli (pot) B. T<sub>1</sub> generation Broccoli (field)  
 C. Chinese Cabbage (pot)



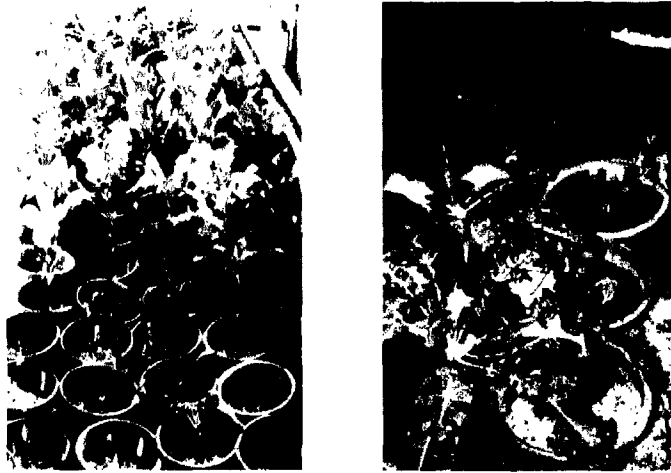


Fig 25. The difference in herbicide resistance after basta treatment  
(T<sub>1</sub>,T<sub>2</sub>)

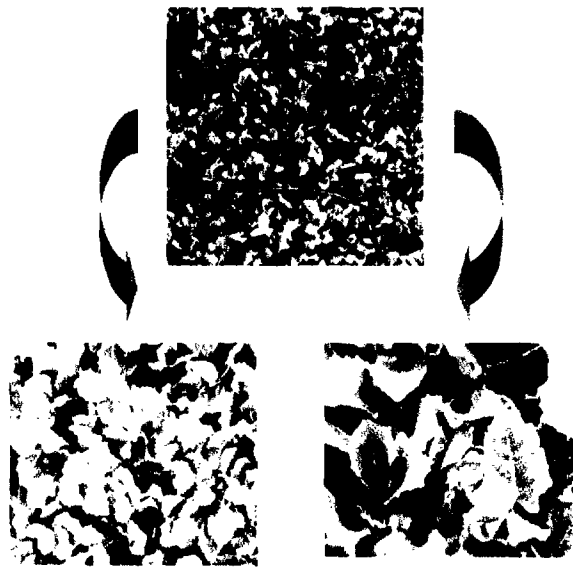


Fig 26. The difference in herbicide resistance after basta treatment (T<sub>3</sub>)

## 제 6 절 적요

본 연구의 목적은 *Agrobacterium*을 이용하여 십자화과 작물의 일대잡종의 양친에 제초제 저항성을 도입함으로써 형질전환 계통의 후대에서 얻어지는 진정한 일대잡종 종묘는 다른 혼입종자들과는 달리 제초제를 살포하였을 때 살아남을 수 있도록 하여 십자화과 작물 종묘의 순도를 적극적으로 높이고, 궁극적으로는 우리나라의 종묘산업과 십자화과 채소 산업의 국제경쟁력을 제고시키려 하는 데 있다. 따라서 본 연구에서는 십자화과 작물의 재분화 체계를 확립하고 이를 이용해 유용유전자가 삽입된 형질전환체를 얻었다. 십자화과 작물의 재분화에 이용한 기본 배지는 Murahige & Skoog medium, 2% sucrose, 0.8% Agar, pH 5.6-5.8를 사용하였다.

배추의 경우 식물의 유전자형에 따라 재분화율이 현저히 다른 결과를 보였으며, 전체적으로는 1.0 mg/L NAA, 3.0 mg/L BAP, 1.0mg/L AgNO<sub>3</sub>가 첨가된 배지에서 재분화율이 좋았다. 절편체 별로 볼 때 하배축이 자엽에 비해 재분화율이 높았는데, 하배축의 경우에는 1.0 mg/L NAA와 3.0 mg/L BAP의 조합에서 30.9%로 가장 좋은 재분화율을 보였으며, 자엽의 경우에는 0.5 mg/L NAA와 3.0 mg/L BAP의 조합에서 21.1%의 재분화율을 나타내었다. 본엽을 절편체로 사용하였을 경우에는 양배추인 KW 28에서는 2%, 케일인 KW 16에서는 11%를 나타내었다. 엽병을 절편체로 사용하였을 경우에는 KW 28에서 1%, KW 16에서 0%를 나타내어 브로콜리보다 낮은 shoot 분화율을 보였다. 획득된 형질전환체에 대해 분자생물학적인 방법인 PCR, Southern blotting, Northern blotting을 이용하여 제초제 저항성 유전자가 식물체 genome 내에 삽입되었는지의 여부와 삽입된 유전자가 제대로 전사되고 있는지를 확인하였다. 특히 브로콜리의 경우에는 T<sub>3</sub>세대에서도 제초제 저항성을 지니고 있음을 확인하였으며, 따라서 이 방법은 십자화과 작물에 있어 종묘의 순도를 적극적으로 향상시킬 수 있는 방법으로 이용될 수 있을 것이라 생각된다.

# 제 4 장 제초제 저항성 유전자 형질전환을 이 용한 박과 작물의 종묘 순도 향상법 개발

## 제 1 절 오이의 형질전환

### 1. 오이의 재분화시스템 확립

#### 가. 재료 및 방법

F<sub>1</sub> 잡종 오이 (*Cucumis sativus* L.) 5 품종 (조생낙합, 미리내, 은성백 다다기, 신희진주, 내서삼척 )과 중앙종묘의 순계 5 계통 (S-♂, S-♀, 244-♂, 244-♀, 95B03)의 종자를 1/4로 희석한 상업용 표백제 및 70% 에탄올로 표면살균후 성장조절제를 첨가하지 않은 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본 고체배지에 치상하여 25℃ 암배양하였다. 발아 7일된 유식물체의 하배축 및 자엽을 5 mm 크기의 절편으로 절단하였다. 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS (MS1D)고체배지를 플라스틱 페트리디쉬 (87 x 15 mm)에 분주한후, 오이의 하배축 절편을 치상하여 25℃ 암조건에서 배양하였다. 배양 3주 후 하배축 절편으로부터 발달한 다양한 캘러스를 성장조절제가 첨가되지 않은 MS기본배지로 옮겨 체세포배를 유도하였다. 또한, 초기에 유도된 2-3 mm 길이의 체세포배를 배축에 수직방향으로 절단하여 MS1D배지에 치상하여 재분화능이 왕성한 배발생캘러스를 유도하였다. 배발생캘러스를 동일 조성의 50 mL의 액체배지를 담은 250 mL Erlenmeyer flask에서 현탁하여 7일 간격으로 계대배양하였다. 현탁배양액에 2-5배의 MS기본 액체배지를 첨가함으로써 체세포배를 생산하였다. 유도된 체세포배를 20 mL의 MS기본 고체배지 [플라스틱 페트리디쉬(87 x 15 mm)]에 평판하여 식물체로 재분화시켰다.

## 나. 결과 및 고찰

배양 2주 후부터 공시한 5 품종 및 4 계통 모두의 오이 하배측질편에서 다양한 켈러스가 발생하였다. 하배측의 중앙부위 및 양 절단면에서 뿌리로 분화하는 켈러스 및 부서지기 쉬운 연노란 색의 비배발생켈러스가 생성되었으며, 배지에 접한 면에서는 기존의 보고(Chee 1990)와 같은 점액성 켈러스 (gelatinous callus)가 발생하였다. 그러나 이러한 점액성 켈러스에서는 1% 이하의 효율로 체세포배가 발달하였을 뿐 배발생켈러스로 유지되지 않고 대부분 MS기본배지에서 뿌리로 분화되었다. 한편 하배측 유래 켈러스 중 F<sub>1</sub> 1품종 '조생낙합'에서는 7.5%, 순계 2 계통 (S-♀와 244-♂)에서는 2%의 효율로 배지에 접하지 않은 표면 쪽에서 체세포배가 발생하였다 (Fig. 1A). 95B03의 경우는 하배측보다는 자엽부위에서 배발생켈러스를 확보하였다. 유식물체의 자엽 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS배지에서 배양하여 배발생켈러스를 유도한 후 체세포배발생을 통한 식물체재분화시스템을 확립하였다 (Fig. 2).

배발생켈러스가 외형적으로 구별되지 않아서 분리 배양할 수 없었다. 배발생켈러스를 유도하기 위하여 유도된 체세포배를 절단하여 MS1D에 배양한 결과 4주 경과 후 약 50%의 질편에서 또 다른 점액성의 켈러스가 발생하였다. 이 점액성 켈러스는 형태적으로 하배측 유래의 점액성켈러스와 같았으나 점액질 내에 노란 색의 수많은 friable 켈러스가 포함되어 있었으며 계속 배양한 결과 노란 색의 friable 켈러스가 우세하게 증식하였다 (Fig. 1B). 이 노란 색의 friable 켈러스는 표면에서 수많은 체세포배로 발달하여 배발생켈러스로 확인되었다. 이렇게 얻은 배발생켈러스는 액체배지에서 쉽게 현탁되어 증식하였다 (Fig. 1C). 한편, 현탁배양 중에 배발생켈러스로부터 계속 체세포배가 발달하였으나, 현탁배양에서 상층부의 현탁액을 분리하여 2,4-D 농도를 낮추었을 때, 훨씬 더 빠르고 많은 체세포배가 발생하였다 (Fig. 1D). 오이의 체세포배는 두 개의 자엽을 가진 것, 여러

개의 자엽을 가진 것, 여러 개의 배가 붙어있는 것 등 다양한 형태를 나타냈다. 유도된 체세포배의 95% 이상이 MS기본배지에서 발아하였다 (Fig. 1E). 유식물체는 화분에서 식물체로 발달하여 개화 후 착과하였다 (Fig. 1F). 오이의 체세포배발생은 기존에 외국품종에서 보고되어 있다. 그러나 대부분 체세포배가 낮은 빈도로 발생하였으며, "Poinsett 76"에서는 하배측 및 자엽의 25-50%에서 점액성 캘러스가 발달하였는데, 이 캘러스는 배지에 접한 면에서 발생하였고 NAA와 BA가 첨가된 성숙배지에 옮겨올 때 배발생캘러스로 발달하였다 (Chee 1990). 본 연구에서는 2,4-D 만을 사용하였을 때, 오이 5품종 모두에서 역시 80%이상의 점액성 캘러스를 얻었으나 기존의 보고와는 달리 대부분 뿌리만 발생하였다. 따라서 점액성 캘러스를 배발생캘러스라고 단정지을 수는 없었다. 한편 F<sub>1</sub> 1 품종 '조생낙합'과 순계 (S-♀와 244-♂)에서는 8%이하로 체세포배가 발생하였으나 하배측의 표면에서 발생한 것으로 배지에 접한 면에서 유도된 점액성 캘러스로부터 발생한 것이 아니었다. 체세포배 절편을 MS1D배지에 배양하여 발생한 새로운 점액성 캘러스에서도 직접 체세포배가 발생하지 않고 계속 배양하였을 때 노란 색의 friable 캘러스가 증식하고 이어서 수많은 체세포배로 발달하였으므로 이 friable 캘러스가 배발생캘러스로 확인되었다.

한편 체세포배를 대량생산하기 위해서는 현탁배양계를 통한 체세포배발생계가 확립되어야 한다. Raharjo와 Punja (1994)는 오이 배발생세포의 현탁배양계에서는 2주 간격으로 계대배양하였을 때 최적의 캘러스 상태를 유지하고, 세포현탁배양으로부터 체세포배를 얻을 수 있었지만 배발생캘러스나 현탁배양계에서의 배발생세포군을 구별하지 못하여 현탁배양세포를 고체배지에 평판하였을 때 일부 (46%)의 세포군에서만 체세포배가 발달하였다. 그러나 본연구에서 확립한 체세포배발생계에서는 배발생세포가 기존에 보고된 배발생세포보다 훨씬 빠르게 분열하여 현탁배양 1주만에 3배 이상의 속도로 왕성하게 증식하였으며, 2,4-D의 농도를 낮춘 액체배지 내에서 1주 내에 수많은 체세포배가 발생하였으며 체세포배의 대부분이 식

물체로 재분화되었다. 한편 예비실험에서 현탁배양시 세포피의 밀도, 2,4-D의 농도, 다른 성장조절제 첨가 등의 변화를 주어 현탁배양 세포군의 크기를 작게 하려고 시도하였으나 배발생켈러스 세포군의 크기는 더 이상 작아지지 않고 200-400  $\mu\text{m}$  크기로 증식하였다.

본 연구에서는 오이의 국내 품종으로 F<sub>1</sub> 잡종과 순계를 사용하여 배발생켈러스의 현탁배양계로부터 체세포배를 대량생산하여 식물체로 재분화시키는 시스템을 확립하였는데 이는 이전에 발표된 시스템(Chee, 1990; Raharjo and Punja, 1994)과 비교할 때 배양과정이 단순하며 식물체 재분화 빈도가 월등히 높다. 본 연구에서 제시된 오이의 식물체재분화 방법은 배발생 현탁배양에 의한 식물체재분화 방법의 일반적인 범주에 속하므로 여러 오이 품종에 대해 일반적으로 적용될 수 있을 것이며 고빈도 식물체재분화가 가능하므로 형질전환에 이용될 수 있을 것이다.



Fig. 1. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Cucumis sativus* L.  
A: Somatic embryos from hypocotyl explant; B: Embryogenic callus from somatic embryo-segment; C: Embryogenic suspension cells; D: Numerous somatic embryos from embryogenic suspension cells; E: Plantlet regenerated from somatic embryo; F: Flowering regenerants.

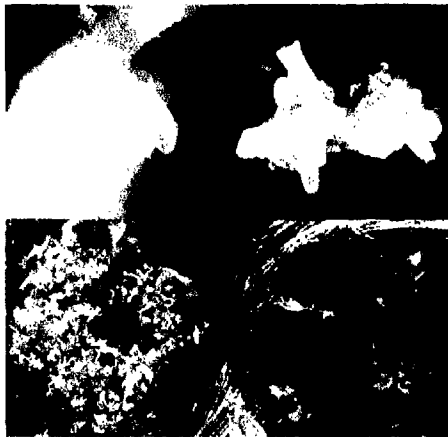


Fig. 2. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cucumber inbred (95B03).

## 2. 오이의 형질전환시스템 확립

### 가. 재료 및 방법

#### 1) 배발생켈러스의 항생제 감수성 조사

형질전환된 배발생켈러스를 선택배지에서 확인하여 선발하기 위한 방법으로서 그 지표 유전자가 될 수 있는 kanamycin (Km), geneticin (Gt), phosphinothricin (PPT) 등의 항생제 내성 유전자가 외래 유전자와 동시에 도입되어 사용되는데, 먼저 이들 항생제에 대한 오이 배발생켈러스의 생육저해 정도를 조사할 필요가 있다. 이를위해 Km 0, 50, 100, 500, 1,000 mg/L, Gt 0, 3, 10, 30, 100 mg/L, PPT 0, 2, 10, 20, 100 ppm 농도가 포함된 150 ml Erlenmeyer flask에서 20 ml의 MS1D (1 mg/L 2,4-D + Murashige and Skoog 기본배지) (1962))액체배지에 오이 배발생 세포 5 ml(v/v)를 1주일간 배양 후 유리관에 옮겨 세포의 증식저해 정도를 조사하였다.

#### 2) 식물체의 형질전환 방법

본 실험에 사용된 *bar* 유전자를 가진 pGA-*bar*는 충남 대학교 임용표 교수님에게서 분양받아 사용하였다. 식물 형질전환 벡터인 pGA-*bar*는 pBG195에서 *bar* 유전자의 start codon을 site mutagenesis로 ATG로 바꾼 후 pBSKS(+) 벡터에 클로닝한 후 binary vector인 pGA748에 subcloning 하여 완성하였다 (Lim et al., 1995)(Fig. 3). pGA-*bar* vector의 *A. tumefaciens* LBA4404 로의 전이는 freeze-thaw 방법을 사용하였다 (Holster et al. 1987).

50  $\mu$ g/ml kanamycin과 2.5  $\mu$ g/ml tetracycline이 첨가된 YEP agar 배지에서 2일간 배양하여 콜로니를 선발하고, 동일한 액체배지에서 28°C에서 2일 동안 암배양하여 접종원으로 사용하였다. 형질전환을 위한 재료는



조생낙합의 배발생 현탁배양세포를 1주일 간격으로 계대배양하여 이용하였다. MS1D 액체배지에서 3일째 배양중인 현탁배양 배발생켈러스 40 ml(v/v)에  $\beta$ -hydroacetosyringone 0.2 mM과 대수기 상태에 있는 *Agrobacterium* 200  $\mu$ l를 첨가하여 25°C gyratory shaker에서 40 rpm으로 48 시간동안 공동 배양하였다. 오이모본의 배발생켈러스 및 자엽질편을 *Agrobacterium* 과의 공동배양법으로 형질전환을 수행하여 basta가 첨가된 배지에서 저항성 배발생켈러스를 선발하고 식물체로 재분화하였다 (Fig. 9).

### 3) 형질전환체의 재분화 및 순화

*Agrobacterium*과 48시간 공동배양 후 형질전환이 확인된 오이현탁 배발생켈러스에서 *Agrobacterium*을 다시 제거하는 항생제인 claforan이 800 mg/L이 첨가된 MS1D 액체배지로 1회 세척한 후, 점차 농도를 낮추어 주면서 2-3회 세척하였다. Claforan 300 mg/L이 첨가된 MS1D액체배지에서 1주일간 현탁배양 후 액체 선발배지 (MS기본배지 + 2,4-D 1 mg/L + claforan 300 mg/L + kanamycin 100 mg/L + PPT 20 ppm)에서 1주일 간격으로 계대배양 하였다. 3주이상 선발하여 고사하지 않고 왕성하게 분얼하는 배발생세포를 PPT만 첨가된 동일한 조성의 고체배지에 평판 배양하여 연녹색의 배발생켈러스와 체세포배를 유도하였다. 현미경하에서 제조체에 저항성을 가지는 체세포배를 선발하여 성숙 배지 (1/2MS + abscisic acid(ABA) 1 mg/L + GA<sub>3</sub> 0.1 mg/L + claforan 300 mg/L + PPT 20 ppm)에서 2주간 광조건에서 배양하여 체세포배를 성숙을 유도하였으며, 발아배지 (1/2MSBM + claforan 300 mg/L + PPT 50 ppm)에서 소식물체를 재생하였다. 멸균된 토양에서 순화를 통해서 뿌리를 발달시킨 후 포장에 이식하였다.

### 4) 형질전환체의 분석

20 ppm 농도의 PPT가 첨가된 배지에서 선발된 기내의 형질전환 식물체의 잎절편으로부터 Edwards (1991) 등의 방법으로 DNA를 분리하고, *nptII* primers (5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3'와 5'-ATCGGGAGCGG CGATACCGTA-3'), *bar* primers (5'GGTCTG-CACCATCGTCAACC-3'와 5'-TCAGATCTCGGTGACGGGCA-3')로 PCR를 수행하여 *nptII*와 *bar* 유전자의 도입 여부를 확인하였다. 한편, 식물체에 *Agrobacterium*의 잔존에 의한 오염 여부를 확인하기 위하여 T-DNA 바깥 부위의 *tet* primers (5'-CTGCTCGCTTCGCTACTTGG-3'와 5'-CTCCAGCGAAAGGGTC CTC-3')를 이용하여 PCR를 수행하였다. PCR 조건은 한국생공의 Pre-mix<sup>TM</sup>을 사용하여 94°C에서 5분간 pre-heating한 후, 94°C에서 1분, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분으로 하여 30 cycle을 반응하였다. 한편, 순화 과정 이후 포장에서 성장하는 오이 잎의 DNA를 추출하여 PCR을 수행하였다. *bar* primer로 증폭된 DNA 산물을 1% agarose gel에서 전기영동한 후 Nytran membrane (Schleicher and Schuell)으로 capillary action을 이용한 방법에 따라 전이하였다(Sambrook et al., 1989). 60°C에서 2시간 동안 hybridization 용액 (5 × SSC, 5 × Denhart's solution, 0.5% SDS)으로 prehybridization 하고 probe 첨가 후 16시간 동안 60°C에서 hybridization 하였다. 이때 사용한 probe는 pGA-*bar* vector를 *ClaI*과 *EcoRI* 효소로 의해 절단한 0.6 kb의 *bar* 유전자 절편을 Rediprime Kit (Amersham)를 이용하여 <sup>32</sup>P로 표지하여 사용하였다. Membrane은 동일한 온도에서 0.2 × SSC, 0.1% SDS 용액으로 30분간 세척하였다. 이후 -70°C에서 6시간 동안 X-ray film에 노출하였다.

앞에서의 total RNA 분리는 guanidinium isothiocyanate (Gibco, BRL)를 이용한 Chomaczynski와 Sacchi (1987) 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 액체질소로 동결된 형질전환 오이 잎조직 1 g을 유발로 마쇄한 후 1.5 ml의 lysis 용액 (50% guanidinium isothiocyanate, 0.5% N-lauryl sarcosine, 0.1% β-mercaptoethanol, 25mM EDTA, 0.1 M Tris-Cl, pH

7.5)을 vortexer로 혼합한 후 RNA를 추출하였다. 6000 x g, 4°C에서 10분간 원심분리 후 상등액을 취한 후 상등액의 0.8 부피의 isopropanol을 첨가하고 동일한 조건에서 원심분리하여 total RNA를 침전시켰다. RNA 침전물을 50  $\mu$ l DEPC-water로 녹인 다음 그 양을 spectrophotometer를 사용하여 측정하였다. 20  $\mu$ g의 total RNA와 25  $\mu$ l formamide, 8  $\mu$ l formaldehyde, 5  $\mu$ l 10  $\times$  MOPS 용액 (0.05 M sodium acetate, 10 mM EDTA, 0.2 M MOPS-NaCl, pH 7.5)을 혼합한 후 65°C에서 5분 처리한 후, denatured RNA를 1  $\times$  MOPS, 0.66 M formaldehyde가 포함된 1% agarose gel 상에서 전기영동하여 전개하고 20  $\times$  SSC용액으로 Nytran membrane에 capillary transfer 방법으로 전이시켰다. Membrane은 RNA hybridization 용액(6  $\times$  SSC, 5  $\times$  Denhart's sol, 0.1% SDS, 50  $\mu$ g/ml calf thymus DNA)에 침지한 후 60°C에서 2시간 동안 prehybridization하고 probe를 첨가하여 16시간 동안 hybridization 하였다. 이때 사용된 probe는 southern blot hybridization시 사용한 것과 동일하였다. Membrane을 세척 용액 (1  $\times$  SSC, 0.1% SDS)으로 60°C에서 3회 세척한 후 -70°C에서 8시간 동안 X-ray film에 노출하였다.

## 5) 포장 시험

제초제가 함유된 배지에서 성장하는 재분화 개체를 순화과정을 거친 후 PCR를 통하여 확인하였다. *bar* 유전자의 도입이 확인된 오이 순화개체는 중앙종묘 오산 연구소에 포장실험을 의뢰하였다. 온실에서 빠르게 성장하는 형질전환 오이 식물체에 농가에서 사용되는 상업적 제초제(Basta, 경농)를 3 ml/L(일반적 사용농도)로 한달 간격으로 전신에 2회 살포하였다. 약제처리 이후 4주간 관찰하였다.

## 나. 연구 결과

### 1) 오이 배발생켈러스의 항생제 감수성 조사

오이 배발생켈러스의 현탁배양 시 형질전환된 세포와 비형질전환된 세포의 구별을 위하여, 다양한 선발물질들을 처리하여 오이 배발생세포의 생장저해 정도를 조사하였다. 이들 오이 배발생세포를 *nptII* 유전자 발현 시에 저항성을 나타내는 항생제인 kanamycin, geneticin과 *bar*의 발현 시에 저항성을 나타낼 수 있는 phosphinothricin을 처리하여 조사하였다.

다양한 농도의 kanamycin 처리의 경우 대조구와 비교하여 큰 생육저해를 나타내지 않았으며 (Fig. 4A), 또한 형질전환 세포를 구별하기 위한 갈변 및 고사현상이 전체 처리구에서 나타나지 않았다. 대조구와 가장 낮은 농도와의 생육저해 정도는 크게 나타나지 않았고, 고농도 처리에서 약 70%의 생육저해만 나타났을뿐 뚜렷한 배발생켈러스 색에는 변화가 나타나지 않았다. 다만 대조구와 달리 모든 처리구에서 점액성 물질생성의 억제에 따라 배지의 점성이 감소하여 tube에 옮긴 후 세포의 침전이 처리농도에 따라 차이를 나타내었다. 대조구의 경우 24시간 이상 방치하여도 침전되지 않았으며 50 mg/L 농도에서 대조구와 가장 유사하였고, 500과 1000 mg/L에서는 수 분 내로 빠르게 침전하였다. 일반적인 처리 농도인 100 mg/L에서도 세포피의 크기가 일부 커졌을 뿐 대조구와 생장의 차이를 나타내지 못하였다 (Fig 4A, D).

Geneticin 처리 경우는 모든 처리구에서 배발생켈러스의 생육이 강력히 저해되는 것을 관찰하였다. 가장 낮은 처리농도인 3 mg/L에서는 대조구의 48% 정도의 성장률을 나타내었다. 10 mg/L 이상의 처리농도에서는 배양 초기의 양에서 증식되지 않았고 흰색을 나타내며 고사하였다 (Fig. 4B). PPT 처리 시에는 다른 항생제의 처리농도 보다 적은 양의 처리 시에도 배발생켈러스의 생육이 강하게 저해되었으며, 처리구 중 가장 낮은 2 mg/L에서도 대조구의 14.6%의 매우 낮은 성장률을 나타내었다 (Fig. 4C). 전체 처리구에서 배발생켈러스의 색의 변화와 생육의 저해가 뚜렷하게 관찰되었다.

## 2) 형질전환 캘러스의 선발 및 재분화

*Agrobacterium*과 2일간 공동배양에 따른 스트레스에 의해서 캘러스의 색이 초기 접종시 보다 연한 노란색으로 관찰되었다. PPT 20 mg/L, Km 100 mg/L과 2,4-D 1 mg/L가 첨가된 배지에서 배양 1일 이후부터 연한 갈색으로 캘러스가 갈변하기 시작하였다. 배양 7일째에는 대조구에 비해서는 분열속도 및 부피의 증가는 낮았으나 일부 노란색의 캘러스가 독립적으로 또는 갈변된 캘러스와 혼합된 상태로 발달하였다. 따라서 선발 배지에 배양 7일째부터 형질전환 유무를 잠정적으로 확인 할 수 있었다. 동일한 조성의 PPT가 첨가된 배지에서 2주간의 계대배양을 통하여 저항성을 가지는 배발생세포의 증식을 유도하였다. 액체배지내에서 선발된 배발생캘러스를 호르몬이 첨가되지 않은 고체배지에 평판 배양하여, 4주 이후부터 캘러스의 표면에서 체세포배가 발달하였다 (Fig. 5A, B). 체세포 저항성을 나타내는 체세포배는 1 mg/L ABA와 0.1 mg/L GA<sub>3</sub> 가 첨가된 1/2MS 성숙배지에서 안정적으로 성숙하여 광조건 하에서 녹색의 유식물체로 빠르게 발달하였다 (Fig. 5C). 형질전환하지 않은 대조구의 배발생세포는 20 mg/L PPT가 첨가된 배지에서 배양 시에 아무런 증식이 나타나지 않고 갈변되어 고사하였다 (Fig 6A, B). 유식물체는 PPT를 50 ppm으로 높이고, 생장조절제가 첨가되지 않은 배지에서 뿌리와 줄기의 발달이 양호하였다 (Fig. 5D). 멸균된 토양에서 순화시킨 이후 정상적인 식물체로 발달하였다 (Fig. 9).

## 3) 형질전환 식물체의 PCR 분석

50 ppm으로 농도를 높여서 PPT가 첨가된 호르몬이 없는 배지에서 정상적으로 성장하는 유식물체 및 순화과정 이후 포장에서 3개월 이상 생장한 잎절편 등 100여개의 재료에서 DNA를 분리하고 그중 일부를 PCR 조사를 실시한 결과, 기내에서 자라는 7개의 유식물체에서 pGA-*bar* 벡터를 주형으로 증폭한 것과 동일한 위치에 *bar*<sup>+</sup> (493bp) 유전자와 *npt* II (약

700bp) 유전자의 band가 확인되었다 (Fig. 6). T-DNA 바깥부위의 primer를 사용하여 PCR 분석 결과 *tet* band (약 500 bp)가 나타나지 않음으로써 7 개체 모두 *Agrobacterium*의 오염이 되지 않았음을 확인하였다. 순화 개체 및 포장에서 완전한 생육을 나타내며 성장하는 식물체 모두에서도 *bar* 유전자의 도입이 PCR로 확인되었다 (사진 미제시). 포장에 이식된 성숙개체에서 PCR 증폭산물이 *bar* 유전자임을 확인하기 위해서  $^{32}\text{P}$ 로 표지된 probe를 사용하여 southern blot 분석 결과, 모든 line에서 PCR 증폭산물이 동일하게 방사능이 표식된 것이 확인되었다 (Fig. 6). pGA-*bar* plasmid 와 *bar* 유전자 단편의 PCR 증폭산물인 positive control에도 동일하게 probe 가 hybridization 된 것으로 보아 형질전환 식물체에 도입된 동일한 유전자의 증폭 산물임을 알 수 있다. 한편 오이 모본의 경우 Basta에 저항성을 나타내는 유식물체를 PCR 분석 결과 유전자의 도입이 확인되었다 (Fig. 10). 한편 모본의 경우 아직 생육이 느려서 기내의 오이 shoots 3개 line 으로부터 RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행한 결과 오이 1개 line 에서 *bar* 유전자의 발현이 확인되었다(Fig. 14).

#### 4) Northern blot 분석

위의 DNA 분석실험에서 조생낙합 오이 genome으로 *bar* 유전자 및 *nptII* 유전자가 도입된 것을 확인할 수 있었으며, 이 후 형질전환 식물체에서 PAT-specific mRNA의 발현을 측정하기 위하여 어린 식물체 앞에서 total RNA를 추출하여 northern blot 분석을 실시하였다 (Fig. 7A). 대조구를 제외한 모든 line에서 *bar* probe을 이용하여 hybridization한 경우, 예상되는 위치(약 600 b)에 동일하게 PAT-mRNA 밴드가 표지되어 있음을 확인하였다.

#### 5) 포장 시험

PAT 단백질의 활성을 확인하기 위하여 PPT 또는 bialaphos가 함유된

상업적으로 판매되는 제초제 (Basta)를 3 ml/L 농도로 형질전환 오이식물체에 살포하여 저항성을 조사한 결과, 온실에서 빠르게 성장하는 조생낙합 오이 형질전환 식물체는 제초제 처리 이후에도 정상적으로 성장하여, 발현된 PAT 단백질이 정상적으로 기능함으로써 제초제에 안정적으로 내성을 나타냄을 확인할 수 있었다 (Fig 8).

## 다. 고찰

### 1) 오이의 형질전환시 선발물질의 선택

현재까지 식물체내로 DNA도입을 위한 다양한 기술이 개발되어 왔으며, 그중 대부분은 nopaline synthase 또는 CaMV 35S promoter에 의해서 발현되는 *npt II*(neomycin phosphotransferase II) 유전자를 이용하여 형질전환체를 선발하였다. 이와 마찬가지로 오이 형질전환체를 선발하기 위해서 동일한 유전자를 이용하였고 선발물질로서는 kanamycin만을 사용하였다. 본 연구에서 사용된 재료인 현탁배양 배발생켈러스는 kanamycin에 의한 생육저해는 크게 차이를 나타나지 않았다. 이는 현탁배양 중인 벼 켈러스에 다양한 항생물질을 처리하여 생육저해정도를 조사한 Dekeyser (1989)의 결과와 매우 유사하였으며, 벼를 포함하는 화분과 식물체에서는 이미 kanamycin에 높은 저항성을 나타내고 있다는 점이 보고된 바 있다 (Hauptmann et al., 1988). 또한 오이의 형질전환체를 개발하기 위하여 Raharjo 등(1990)은 kanamycin이 함유된 선발배지에서 장기간의 배양에 의해서 선발된 배발생켈러스가 재분화능이 감소하는 것을 보고하였다. 이와같이 오이의 형질전환체 생산을 위하여 배발생켈러스의 선발 물질의 사용시 kanamycin 사용에 따른 장기간의 선발기간 때문에 배발생켈러스의 증식율 및 발아율 감소를 야기하는 것보다는 단기간에 선발이 가능한 10-20 mg/L의 geneticin과 10 mg/L의 PPT이 사용이 적절할 것으로 보여

진다. 형질전환체 선발에 PPT를 이용하는 방법은 PPT가 낮은 농도에서도 형질전환되지 않은 세포 및 식물체를 체내 암모니아( $\text{NH}_4^+$ ) 축척에 의해서 고사시키기 때문에 효과적인 selection agent로 보고되어있다(Shan et al., 1986; Akama et al., 1995). 또한 형질전환체의 개발에 문제점인 chimera가 유도되었을 경우 비형질전환세포의 암모니아 축척에 의해 고사하고 2차적으로 주변세포에 영향을 주어 초기에 형성을 억제하는 효과적인 선발물질이다. 이와 같이 본 실험에서의 오이 배발생켈러스에 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환의 선발물질로서 geneticin은 저농도에서도 강한 생육저해를 나타내었으나, kanamycin은 부적합하였다. 또한 *in vivo*에서 강력한 제초제로서 사용되는 PPT가 *in vitro*에서도 미량의 처리로 강한 생육 억제효과를 나타냄을 알 수 있었다. 이와 같이 식물형질전환시 사용되는 선발물질의 효과적인 사용은 세포의 종류, 세포의 성장단계, 처리시기 그리고 가장 중요한 처리 농도와 처리 물질 선택의 조합을 고려하여 사용되어야 할 것이다.

## 2) 현탁배양 배발생켈러스의 형질전환

현재까지 배발생켈러스를 형질전환 재료로 사용한 많은 실험은 대부분 직접적인 DNA 도입(particle bombardment, electroporation, PEG-transformation 등)이었다. 반면에 현탁배양 중인 배발생켈러스에 *Agrobacterium*의 T-DNA 전이과정을 이용한 형질전환 기술은 최근까지 rice(Hiei et al., 1994), grape(Perl et al., 1996), soybean(Trick and Finer 1997, 1998) 등이 있을 뿐 많은 보고가 되어있지 않다. 그 중 soybean의 경우 sonication을 통한 배발생현탁배양세포의 상처를 유기한 후 *Agrobacterium*을 이용하여 형질전환효율을 높였다. 본 연구의 실험재료에서 형질전환을 위하여 현탁배양중인 오이의 배발생켈러스를 재료로 이용한 경우는 최초이며, 한 flask내에서 *Agrobacterium*의 접종 및 선발과정을 동시에 한 실험방법은 보고되어 있지않다. 이와 같이 분열능과 재분화능이



강한 배발생켈러스의 현탁배양계에 직접 *Agrobacterium* 접종을 통한 형질 전환방법은 기존의 배발생켈러스를 이용한 particle bombardment 방식의 형질전환과 재분화능을 가진 배발생세포의 protoplast를 이용한 형질전환 방법에서 나타나는 문제점을 극복할 수 있으며, 단기간에 형질전환 개체를 대량 생산할 수 있는 방법으로 사료된다. 또한 PPT에 의한 선발법은 약 100여 개체의 PCR 및 northern blot 분석 결과 모든개체에서 형질전환이 확인되었으며, 이는 kanamycin 내성에 대한 선발법의 경우 나타나는 비형질전환체의 높은 효율의 출현에 비하면 강력한 설발물질임을 알 수 있었다.

한편 담배에서 *bar* 유전자의 PAT-specific mRNA의 발현 및 축척에 의해서 식물체내의 안정적으로 PAT 단백질의 합성 및 기능을 처음으로 보고 (De Block, 1987)한 것과 같이, 현탁배양이 가능한 배발생계를 이용하여 생산된 제초제 저항성 오이에서도 RNA분석을 통하여 *bar* 유전자가 전사 수준에서 발현되고 있음을 확인할 수 있었으며, 또한 포장에서 제초제의 저항성을 나타냄으로써 도입된 *bar* 유전자에서 안정적으로 단백질이 합성(translation)되어 기능함을 확인할 수 있었다. 이후 본 제초제 저항성 오이와의 교배 통한 육종과정 중 F<sub>1</sub> 잡종종자 확인에 지표 유전자로 이용이 가능하므로 순도향상에 사용될 수 있다.

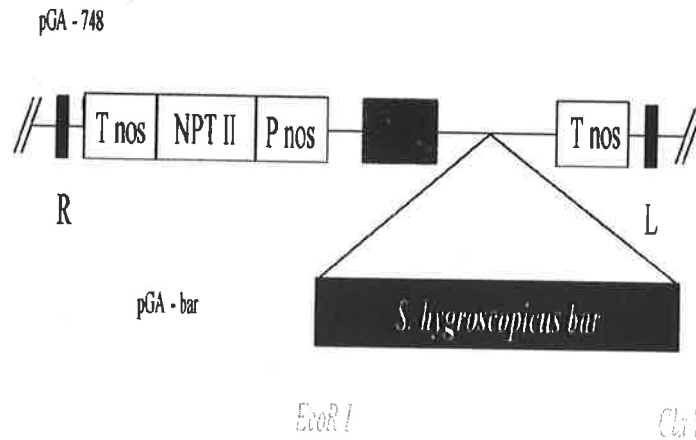


Fig. 3. Map of the plasmid pGA-*bar*.

PCR clone of the 612bp *EcoRI*-*ClaI* fragment encoding *bar* (PPT resistance gene) was inserted into the same enzyme site of the plasmid pGA748 ((plant expression vector with CaMV35S promoter, NOS terminator and multiple stop codon) (provide for Dr. YP Lim.)). BL and BR represent left border and right border of T-DNA, respectively.

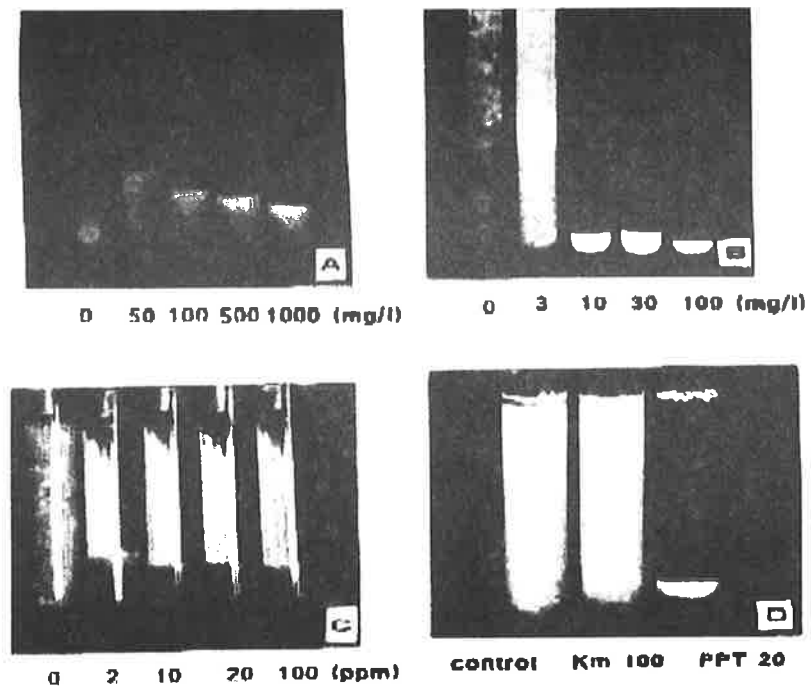


Fig. 4. Sensitivity of embryogenic suspension cells of cucumber (*Cucumis sativus* L) in different selection agents. Suspension cells were observed after culturing with selection agents for one week.

A: Kanamycin; B: Geneticin; C: Phosphinotricin

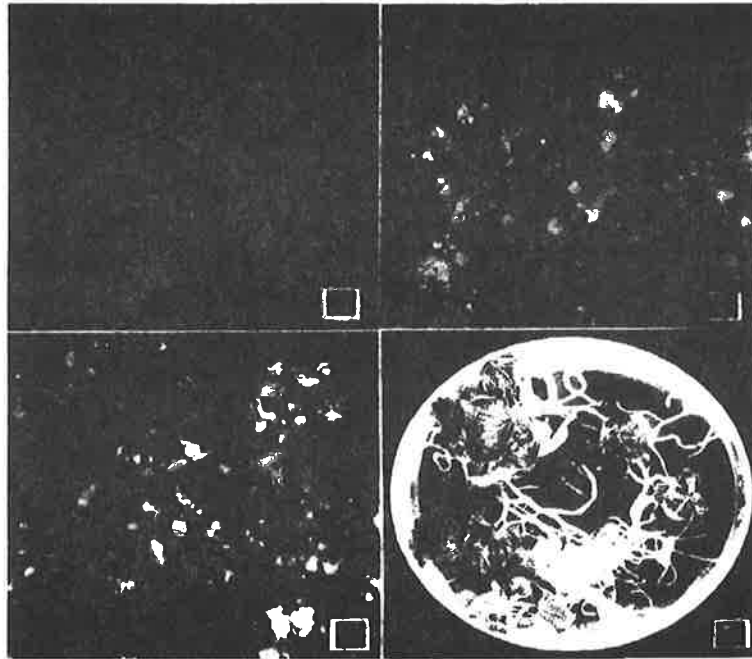


Fig. 5. Development of PPT resistant cucumber plantlets using embryogenic cells transformed with *Agrobacterium* harboring *bar* gene.

A: Appearance of somatic embryos on selection medium supplemented with 20 ppm PPT B: Discoloration of PPT resistance green cell and somatic embryos in light condition on selection medium supplemented with 20 ppm PPT C: Plantlet regenerated from somatic embryos on selection medium supplemented with 20 ppm PPT D: Green plantlets with rooting on MS basal medium containing 50 ppm PPT.

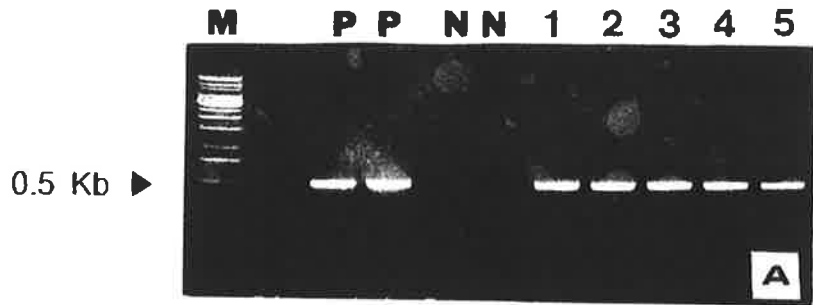


Fig. 6. Agarose gel electrophoresis (A) and Southern blot analysis (B) of PCR products amplified from transgenic and non-transgenic cucumber plants. *bar* DNA fragment labelled with  $^{32}\text{P}$ -dCTP was used as a probe.

P: positive control pGA-*bar* Plasmid); N: negative control (non-transformed plant); M: Molecular size marker; Lane 1-5, transgenic plantlets.

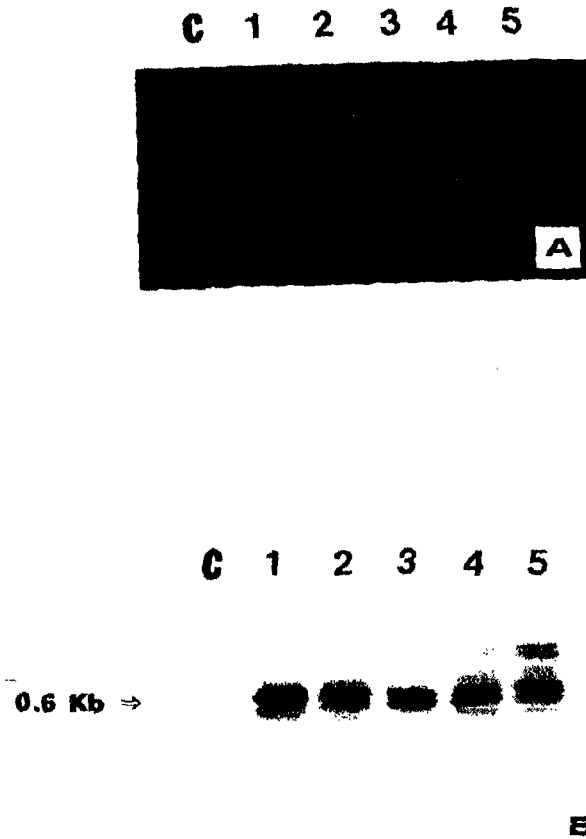


Fig. 7. Northern blot analysis of transgenic cucumber plants.

A. Total RNA stained with Ethidium Bromide.

B. Total RNA was hybridized with *bar* DNA fragment labelled with  $^{32}\text{P}$ -dCTP.

C: non-transformed plant; Lane 1-5: transgenic plantlets.

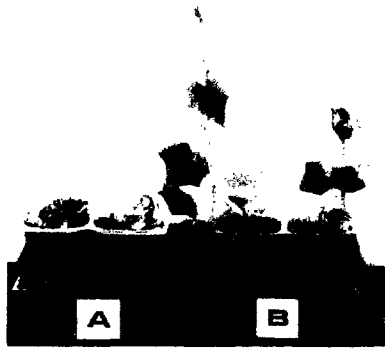


Fig. 8. Basta resistant transgenic cucumber

A: non transgenic cucumber; B: transgenic cucumber

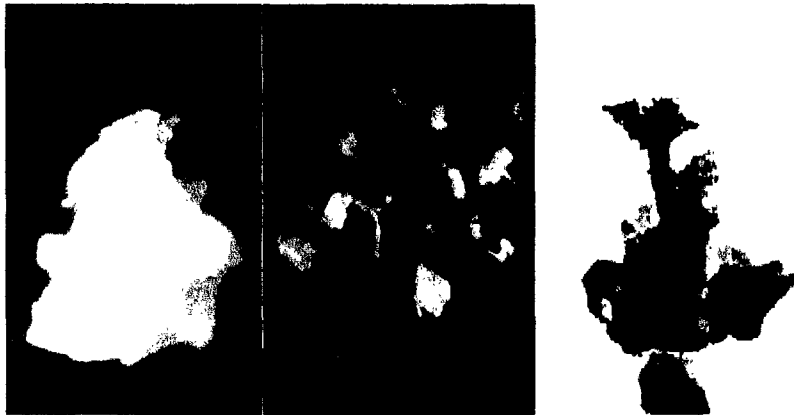


Fig. 9. Bialaphos resistant callus and shoots in cucumber inbred line.

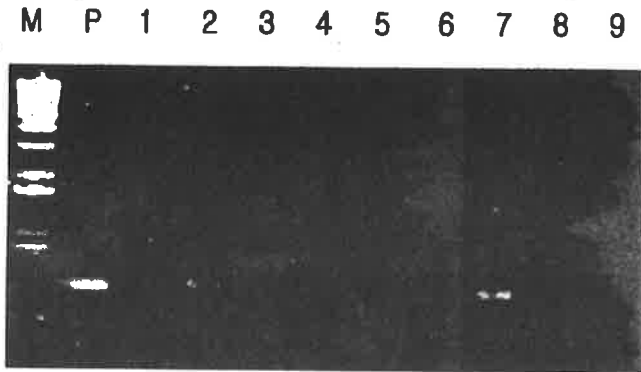


Fig. 10. PCR analysis for the *bar* gene from shoots of cucumber inbred line. The bands of 0.5kb indicate *bar* gene. M: size marker; P: Positive control; lane 1-9: cucumber shoots.



## 제 2 절 수박의 형질전환

### 1. 수박의 형질전환

#### 가. 재료 및 방법

##### 1) 형질전환을 위한 수박 및 균주 재료

수박 모본(JWA-1, JWA-3) 및 F<sub>1</sub> 맛수박, 감로수박, 단비, 은세상, 대상, 빛나, 환호성의 종피를 제거한 후 1/3로 희석한 상업용 표백제로 표면살균후 성장조절제를 첨가하지 않은 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본 고체 배지에 치상하여 25℃ 암배양하였다. 발아 3-5일된 유식물체의 자엽을 분리하여 성장점부위를 제거하고 1 mg/L BA가 첨가된 MS배지에서 3일간 전배양하였다. 전배양된 자엽절편을 형질전환에 사용하였다. pGA-*bar* vector를 *A. tumefaciens* LBA4404 로 도입하여 (Holster et al. 1987), 50 µg/ml kanamycin과 2.5 µg/ml tetracycline이 첨가된 YEP agar 배지에서 2일간 배양하여 콜로니를 선발하고, 동일한 액체배지에서 28℃에서 2일 동안 암배양하여 접종원으로 사용하였다.

##### 2) 형질전환

3일간 전배양한 자엽절편을 1 mg/L BA가 첨가된 MS액체배지에 넣고 200 uM의 acetosyringone을 첨가후 2일간 배양한 *Agrobacterium*을 넣어 2일간 공동배양하였다. 공동배양한 후, 액체배지로 균을 세척하고 100 mg/L claforan, 100mg/L kanamycin, 2 mg/L Basta가 첨가되고 1 mg/L BA가 첨가된 MS배지에 5-10개씩의 자엽절편을 치상하여 3주간 shoot을 유도하였다. 선발배지에서 저항성을 가지는 shoot으로부터 DNA를 분리하여 PCR 방법으로 형질전환 유무를 확인하였다. *bar* primers (5' GGTCTGCACCATCG TCAACC-3' 와 5'

-TCAGATCTCGGTGACGGGCA-3')로 PCR를 수행하였으며 positive control로 pGA-*bar* vector를 사용하고 negative control로 형질전환하지 않은 수박의 DNA를 사용하였다. 제초제내성을 가지고 PCR분석으로 확인된 수박의 shoot을 중앙종묘에 이전하여 대목에 접붙임으로써 식물체로 순화시켰다.

#### 나. 결과 및 고찰

배양 2주경부터 4주동안 절편부위에서 shoot이 발생하였다. 그러나 절단면의 중앙에서 발생한 shoot은 생장이 아주 빠르기 때문에 제거되지 않은 meristem에서 발달한 것으로 판명되어 제거하였다. 한편 절단면에서 meristem이 있던곳에서 떨어진 곳에서 품종에 따라 10-50%의 효율로 shoot이 발생하였다 (표 1). 선발배지(2 mg/L Basta)에서 내성을 가지는 shoots은 녹색을 나타내며 정상적으로 증식하였으나 형질전환되지 않은 shoot은 배양 5일째부터 갈색으로 변하여 고사하였다 (Fig. 11). 이처럼 제초제 내성을 가지는 shoot으로부터 DNA를 분리하여 동일한 조성의 배지에 계대배양 후, 유식물체 1000 개체중 128 개체를 PCR분석한 결과 36 개체 (28%) 에서 *bar* 유전자의 도입이 확인되었음(Fig. 12). 기내에서 선발하여 중앙종묘에 이전하여 순화된 line들의 후대(T1)에서도 PCR 수준에서 50%의 확률로 유전자의 도입이 확인되었다 (Fig. 13). 한편, 수박 식물체의 후대 (T1) 4개체로부터 RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행한 결과 수박 1개 식물체에서 *bar* 유전자의 발현이 확인되었다 (Fig. 14).

표 1. 수박의 형질전환 효율

품종	Kanamycin selection	Basta selection	PCR for bar gene
감로수박	35.9 %	66.7%	50%
맛 수박	43.4 %	45.8%	72.7%
JWA-1	11.7 %	-	-

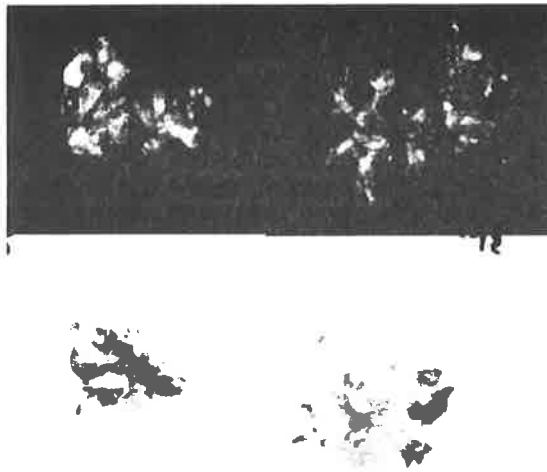


Fig. 11. Bialaphos resistant shoots of watermelon.

Brown shoots unable to survive on selection medium containing basta. green shoots growing on selection medium containing basta (5 mg/L).

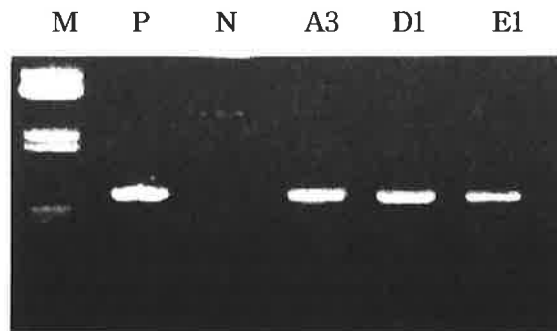


Fig. 12. PCR analysis for the *bar* gene from bialaphos resistance watermelon shoots. The bands of 0.5kb indicate *bar* gene. M: size marker; P: Positive control; N: non-transgenic plantlets; lane 1-12 basta resistance plantlets.

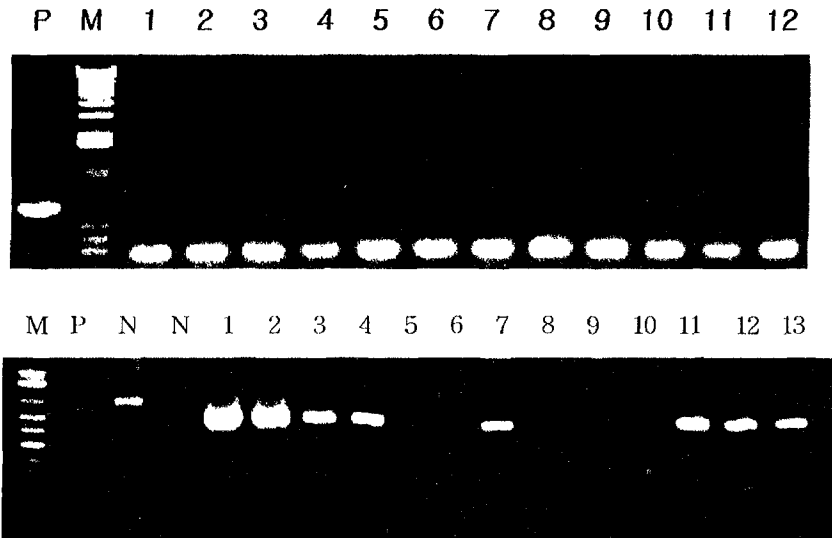


Fig. 13. PCR analysis for the *bar* gene from T<sub>0</sub> and T<sub>1</sub> plants of watermelon. The bands of 0.5kb indicate *bar* gene. M: size marker; P: Positive control; N: non transgenic; A3, D1 and E1: T<sub>0</sub> plants of inbred watermelon; lane 1-12: T<sub>1</sub> plants of inbred watermelon.

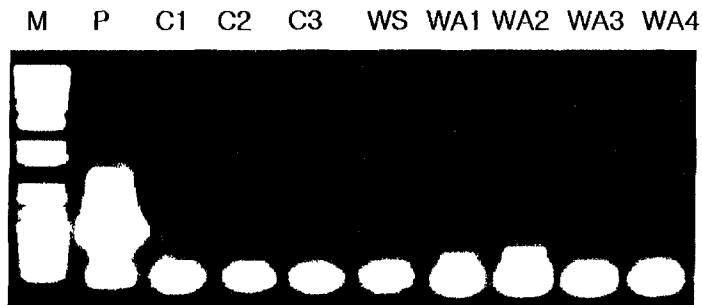


Figure 14. RNA expression by RT-PCR analysis for the *bar* gene from cDNA of cucumber and watermelon. The bands of 0.5kb indicate *bar* gene. M: size marker; P: Positive control; C1-3: cucumber shoots;

# 제 5 장 형질전환용 계통 육성 및 제초제 저항성 일대잡종의 실용화

## 제 1 절 서 설

형질전환에 대한 관심이 증가하면서 이에 대한 많은 연구가 수행되고 있으나 국내의 경우 형질전환에 의한 품종의 개발이나 이의 응용실례가 전무한 상태이다. 이의 원인에 대해서는 여러 측면에서 검토가 필요하다고 생각되나, 형질전환 연구를 수행하는 연구자들의 식물체 순화 및 유지 증식 실용화에 대한 이해와 경험이 부족하여 후속 연구의 수행이 미진해지는데 큰 요인이 있는 것으로 판단된다.

본 과제에서는 작물의 순화, 고정, 유지, 증식, 실용화에 대한 많은 경험과 다양한 유전자원 및 실용 계통을 확보하고있는 중앙종묘에서 작물에 따라 분담된 형질전환 연구팀에 형질전환용 계통을 육성하여 공급하고 형질전환된 식물체를 인수받아 순화한 후 후대를 유지하고, 후대에서 형질전환 식물체의 유전적 안정성 검정과 함께 유전자가 동형접합상태인 계통을 선발하고 선발된 형질전환 계통을 부계친으로 비형질전환 계통을 모계친으로 하여 일대잡종 종자를 생산하고 일대잡종에서 형질전환 유전자의 발현을 확인하여 일대잡종의 실용화를 추진하고자 하였다.

## 제 2 절 연구개발 목표

가지과, 박과, 십자화과 채소 작물 중 형질전환에 사용할 계통을 육성하여 증식 공급하고 획득된 형질전환 식물체를 인수하여 순화, 유지, 증식시키고, 형질전환된 제초제 저항성 유전자가 동형접합 상태인 식물체를 선발하여 제초제 저항성 일대잡종을 실용화하기 위한 연구를 수행하고자 하였

다.

먼저 다양한 유전 자원을 수집하고, 수집된 유전자원으로부터 유용 유전 자원을 검정 선발하고 순화하여 형질전환에 이용할 소재를 확보할 목적으로, 본 과제를 통하여 보다 다양한 유전 자원을 수집하여 유용 유전자를 탐색하고 순화 과정을 거쳐 형질전환에 이용할 계통을 육성하였으며 육성된 계통들을 증식하여 각 작물별 형질전환 팀에 공급하였다. 그리고, 작물별 형질전환 팀으로부터 획득된 형질전환 식물체를 인계 받아 순화하여 후대를 유지하였으며, 제초제에 대한 저항성 발현을 검정하고 저항성을 발현하는 개체를 선발하여 후대에서 제초제 저항성 유전자가 동형접합인 개체를 선발하고 이를 부계친으로 하여 일대잡종 종자를 생산하여 형질전환에 의하여 획득된 제초제 저항성 계통과 비형질전환 정상 계통과의 채종에서 제초제 저항성의 발현을 확인하고자 하였다.

본 연구팀에서는 본 과제 시작 전부터 중앙종묘(주)에서 개발하여 실용화 단계에 있는 재료와 새로이 수집한 재료들을 이용하여 형질전환 식물체 개발에 사용하고자 하였다.

## 제 3 절 연구내용 및 결과

### 1. 유전자원의 수집

유전자원의 수집은 중앙종묘의 국내외 판매망을 통하여 수집하였으며 중앙종묘에서 육성하여 이용중인 재료를 증식하여 형질전환 팀에 공급하였다. 본 과제와 관련하여 수집한 유전자원은 가지과 126점, 박과 64점, 십자화과 289점으로 총 479점이었다.

### 2. 유전자원의 특성검정 및 계통육성

수집된 유전자원의 활용성을 검토하여 유용 유전자원을 선별하고 선별한 유전자원을 계통으로 육성하기 위하여 실시한 작물별 선발 항목은 다음과 같다.

## 가. 재료 및 방법

### 1) 가지과 작물

#### 가) 역병 저항성 검정

가지과 유전자원 가운데 고추를 대상으로 1차 연도와 2차 연도에 지제부 관주법에 의하여 역병 저항성 계통을 선발하였다.

고추의 역병 저항성 계통 선발은 중앙종묘에서 수집하여 활용중인 균주 가운데 병원성이 강한 경북 의성 지방 수집균을 사용하였다. 접종은 지제부관주법에 의하였으며  $10^5$ /mL 농도로 6월 초순에 접종을 실시하고 접종 1주 후에 조사하였다.

#### 나) 융성불임성 계통 육성

고추의 융성불임성 계통 육성을 위한 유지친 계통의 backcross를 실시하였다.

### 2) 박과 작물

#### 가) 저온착과성 검정

박과 유전자원 가운데 수박을 대상으로 1차 연도와 2차 연도에 저온기 재배를 통하여 개약온도에 따른 저온착과성을 조사하여 선발하였다.

수박의 저온착과성 계통 선발은 전날밤의 최저 온도와 개화 당일의 오전 9시 온도를 기준으로 수꽃의 개약 상태를 조사하여 저온에서 개약이 이루어지는 계통을 선발하였다. 수박은 11월 하순에 파종하여 45일간 육묘 후 정식하였으며 2월 하순부터 3월 상순에 걸쳐 개약 상태를 조사하였다. 화분발현이 50% 이상으로 안정된 계통을 선발의 기준으로 삼았다. 온풍

난방기를 사용하여 야간온도를 15℃로 유지하였으며 개화당일 오전 온도 20℃를 계통 선발의 기준으로 사용하였다.

#### 나) 형질전환용 재료 육성

수박의 경우 형질전환 효율을 높이기 위하여 형질전환 팀에 공급중인 계통을 격리 망실에 재배하여 인공수분을 실시하고 수분일자별로 다양한 미숙과를 형질전환 팀에 공급하였으며, 아울러 수박과 오이 선발 육성 계통을 증식하여 성숙 종자를 함께 형질전환용 소재로 공급하였다.

### 3) 십자화과 작물

#### 가) 무사마귀병 저항성 검정

배추와 순무 계통에 대해 1차년도와 2차년도에 경기도 의정부에서 수집한 무사마귀병균을 이용하여 병토삽입법에 의한 무사마귀병 저항성을 선발하였으며, 3차, 4차년도에는 강원도 평창군에서 수집한 무사마귀병균을 이용하여 저항성 계통선발을 수행하였다. 병토삽입법은 다음과 같다. peat : perlite : vermiculite : 멸균토양을 1 : 1 : 2 : 1로 혼합한 배양토에 병균 농도를 10<sup>6</sup>/g(건토)으로 조절한 현탁액을 혼합하여 병토를 만들어 24시간 실온에 방치 한 후 멸균상토를 넣은 9공 연결포트에 직경 3cm 정도의 시험관으로 4-5cm의 깊이로 눌러 구덩이를 만들고 조제한 병토를 구덩이 속에 삽입하고 병토의 중앙에 2-3립의 종자를 파종하였다. 파종한 종자는 vermiculite로 복토하였으며 발아하여 자엽이 전개되었을 때 1주만 남기고 나머지 묘는 제거하였다. 접종상의 재배관리는 토양수분이 포화상태가 유지되도록 저면관수를 하여 4주간 유지하였으며 파종 후 40일에 조사하였다.

#### 나) 자가불화합성 검정

배추, 순무, 양배추, 브로콜리, 차이니스케일 등을 대상으로 일대잡종 육성에 이용하기 위한 필수 요건인 자가불화합성을 검정하였다. 자가불화



합성 검정은 당일 개화한 25개의 꽃에 신선한 꽃가루를 수분한 후 등숙기에 해당 종자수를 조사하여 판정하였다. 해당종자수 2립 이하를 자가불화합성이 강한 것으로, 2-5립을 중간으로, 5립 이상을 약한 것으로 판정하였다. 십자화과 작물의 자가불화합성 검정에서 도입 당시 세대의 자가불화합성에 개체 변이가 존재하는 경우 계통육성 과정에서 자가불화합성의 강약을 선발의 주된 기준으로 사용하지는 않았다. 이는 음성불입성을 이용한 일대잡종 생산에 이용할 경우 계통의 자가불화합성의 강약은 육성자의 관점이나 이용형태에 따라 각기 장단점 어느 쪽으로도 작용할 수 있기 때문이다. 그러나, 본 과제에 사용한 재료는 자가불화합성을 이용한 일대잡종 생산을 전제로 하였으므로 자가불화합성이 강한 재료를 형질전환에 사용하도록 증식하여 공급하였다. 3년차에는 1-2년차에 선발된 배추의 무사마귀병 저항성 계통과 TuMV 저항성 계통을 대상으로 계통당 8주씩 정식하여 계통의 자가불화합성 검정을 실시하였다.

#### 다) TuMV 검정

배추 재료 가운데 1차 연도에 무사마귀병 저항성이 인정된 계통은 2차년도에 TuMV 저항성 검정을 실시하였다. 배추의 TuMV 저항성 검정은 중앙종묘에서 분리하여 사용중인 TuMV계통을 순무에 접종하여 증식한 후 병징이 전신감염으로 나타난 이병엽을 채취하여 이들 감염엽에서 추출한 즙액을 바이러스 접종원으로 이용하였다. 9공 연결포트에 파종하여 본엽이 6-7매 전개된 배추잎에 carborundum을 이용하여 접종하였으며 접종 전 2일 동안 50% 차광망으로 차광을 실시하였다. 접종 후 7일과 12일에 조사를 실시하였다.

#### 라) 계통 육성

배추에 순무의 무사마귀병 저항성 인자를 도입하기 위한 backcross와 재분화율이 높은 순무와 배추를 교잡하여 형질전환용 재료로 이용하기

위한 교배육성을 실시하였다.

## 나. 연구결과

### 1) 1차년도

#### 가) 가지과 작물

고추에서 역병저항성 16계통을 선발하였으며 RAPD 순도검정을 위한 재료를 공급하였다. RAPD를 이용한 순도검정을 위해서는 ‘대명’과 ‘광복’ 두 품종과 이들 품종의 양친 식물재료를 공급하고 중국에서 채종된 ‘대명’ 종자의 순도검정을 서울대에 의뢰하여 정확한 순도검정 결과를 얻을 수 있었다.

#### 나) 박과 작물

수박에서 저온착과성 10계통을 선발하였으며 이들 중 4계통을 증식하여 박과 형질전환 팀에 공급하였다.

#### 다) 십자화과 작물

배추와 브로콜리에서 자가불화합성 36계통, 무사마귀병 저항성 26계통을 선발하였으며 이들 중 배추 6계통과 브로콜리 4계통을 증식하여 십자화과 형질전환 팀에 공급하였다.

### 2) 2차년도

#### 가) 가지과 작물

고추 65계통의 임성검정을 실시하였으며 이들 중 54계통은 유지계로 11계통은 회복계로 조사되었다. 1차년도에 역병 저항성으로 조사된 계통들의 후대 검정결과 11계통은 저항성이 안정적인 것으로 판정하였으며, 5계통은 저항성 인자가 분리중인 것으로 조사되었다.

#### 나) 박과 작물

수박에서 1차년도에 저온착과성인 것으로 조사된 계통의 후대검정을 겸하여 실시한 저온착과성 선발에서 1차년도에 선발된 10계통을 포함하여 40계통의 자식종자를 유지하였다.

#### 다) 십자화과 작물

배추에서 1차년도에 자가불화합성이 강한 것으로 선발된 계통과 신규계통을 포함하여 176계통에 대하여 임성검정을 실시하여 자가불화합성 42계통을 선발하여 자식종자를 획득하였다. 무사마귀병 저항성 검정은 1차년도에 선발된 계통의 후대 검정을 실시하여 22r p통을 선발하여 자식종자를 획득하였다. 무사마귀병 저항성 22계통을 포함한 40계통에 대하여 TuMV 저항성 검정을 수행하였으나 무사마귀병 저항성 계통 가운데 TuMV에 저항성을 인정할만한 계통을 선발하지는 못하였다. 자가불화합계통과 무사마귀병 저항성 계통간의 120조합을 포함한 150조합에 대하여 조합능력 검정을 수행하였으나 실용화 가능한 조합을 선발하지는 못하였으며, 대부분의 재료들의 순화 고정이 덜된 상태로서 균도의 보완이 요구되는 것으로 확인되었다.

### 3) 3차년도

#### 가) 가지과 작물

가지과 작물의 형질전환에 쓰일 계통을 증식하여 가지과 형질전환팀에 분양하였다.

#### 나) 십자화과 작물

배추의 무사마귀병 저항성 계통중 4계통과 바이러스 저항성 계통중 7계통이 개화수분시 협당 종자립수가 2립 이하로 자가불화합성이 매우 강하며 자가불화합성 인자도 고정된 것으로 판정되었다.

#### 4) 4차년도

##### 가) 가지과 작물

가지과 형질전환팀에 분양할 계통 8가지를 증식하여 분양하였다.

##### 나) 박과 작물

선발된 수박 4계통을 격리 망실에 정식하여 인공교배하고 미숙배를 형질전환에 이용하기 위하여 미숙과를 박과 형질전환 팀에 공급하였으며 동시에 증식을 수행하여 성숙 종자를 공급하였다. 오이는 증식을 수행하여 성숙 종자의 상태로 형질전환 팀에 공급하였다.

### 3. 형질전환 식물체의 순화, 후대 유기 및 동형접합체 선발

기내에서 나온 식물체는 peat : perlite : vermiculite를 1 : 1 : 1의 비율로 혼합한 배양토를 이용하여 순화하였으며 포트에 정식 후 플라스틱필름을 피복하여 공중습도를 기내에서와 유사한 정도로 높이도록 하였다. 순화된 식물체의 2차 이식 시에는 일반토양과 부엽을 1 : 1로 혼합한 상토에 이식하였다. 근계의 발달이 충분히 이루어진 식물체의 종자를 받기 위한 이식에는 시판(대성사 “상토”) 상토를 사용하여 대형 포트에 이식하였다.

#### 가. 가지과 작물

고추는 가지과 작물 형질전환팀으로부터 제초제 저항성 유전자가 형질전환된 T<sub>0</sub> 세대의 미숙과실을 분양받아 배배양을 통하여 10주의 T<sub>1</sub> 세대를 획득하였으며, T<sub>1</sub> 세대에서 과실을 수확한 후 0.3%의 바스타를 처리하였으나, T<sub>1</sub> 세대 전 개체에서 0.3%의 바스타 용액에는 제초제 저항성이 발현하지 않았다.

## 나. 박과 작물

오이는 박과 작물 형질전환팀으로부터 3년차에 인수한 식물체를 플라스틱 하우스 내에 정식하여 일반형질을 조사하고 인공교배를 수행하였다. 형질전환 식물체의 원예적 형질은 모든 면에서 비형질전환 식물체와 동일하였다. 종과 수확 후 시판 바스타를 살포하여 형질전환 식물체가 바스타에 대하여 저항성을 발현함을 확인하였다. 수확한 종과는 2 주간의 추숙과정을 거친 후 탈종하였으나 형질전환 식물체로부터 수확한 과실에서는 정상적으로 성숙한 종자를 얻지 못하였다. 동시에 재배되고 교배한 계통들에서는 정상적으로 증식이 이루어졌으며 교배 당시 형질전환 식물체의 자성기관이나 응성기관에서 이상을 발견하지 못하였고 교배가 정상적으로 이루어졌고, 교배 후 과실의 성장이 정상적으로 이루어진 점으로 볼 때 정확한 불임의 원인은 파악할 수 없었다. 따라서, 형질전환 식물체의 후대를 유지하기 위한 수단으로 자가수분과 아울러 형질전환 식물체를 자방친으로 사용하는 교잡 방법과 형질전환 식물체를 화분친으로 사용하는 교잡 방법 등 다양한 시도를 할 필요성이 있을 것으로 판단된다. 이는 특히 수분 이후 종자의 성숙을 확인하는 데에 많은 시간을 요하거나 일정 시기가 경과하면 교배가 불가능한 작물의 경우에 더욱 고려되어야 할 사항으로 판단된다.

수박은 형질전환된 조직에서 발근이 이루어지지 않고 기내에서 고사하는 문제가 발생하였다. 발근이 이루어지지 않고 기내에서 고사하는 문제를 해결하기 위하여 박과작물 형질전환팀으로부터 발근되지 않은 기내의 조직을 인수하여 접목을 시도하였다.

형질전환된 기내의 조직은 줄기신장이 이루어지지 않은 상태에서 줄기조직이 노화되어 접목 작업이 매우 어려울 뿐 아니라 접목의 경우에도 활착율이 매우 저조하였다. 줄기의 신장을 보이지 않고 조직의 노화가 진행된 조직은 줄기 조직 내에 공동이 형성되어 접목 시에 분열조직을 대목과 접합시킬 부위를 찾는 데에 어려움이 따랐으며 실제 대목과 접수 사이에

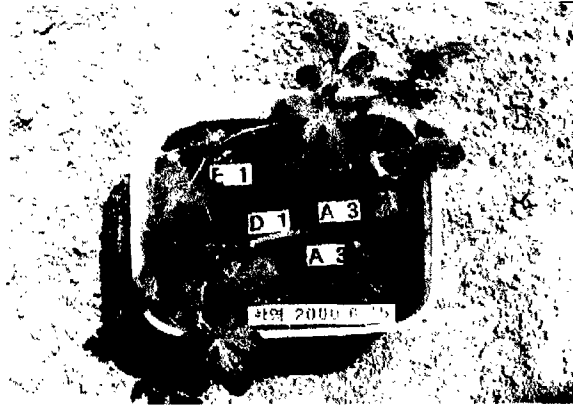


그림 112. 접목을 통한 수박 형질전환체의 순화

접착 면적이 매우 협소한 반면 접수의 절단면은 넓어 접목 성공률이 낮은 것으로 생각된다.

접목 시에는 참박을 대목으로 사용하였으며, 접목 방법은 삼접을 실시하였다.

PCR에 의하여 제초제 저항성 유전자의 삽입이 확인된 수박 10 line를 인수하여 접목을 실시한 결과 3 line에서 4주의 접목 식물체를 얻었다. 접목에 의하여 획득된 형질전환 식물체를 폭 6 m의 플라스틱 하우스에 주간 거리 1 m로 정식하고 격리재배 하였으며 생장을 왕성하게 하여 많은 종자를 획득코자 하였다. 정식된 형질전환 수박은 5마디에서 적심하여 4개의 측지를 키웠다. 인공수분을 실시하여 1주당 2개의 과실을 3화방에 착과시켰다. 접목재배한 4주의 식물체로부터 각 2개의 과실을 수확하고 수확한 과실을 2주간의 추숙 과정을 거친 후에 탈종하였다. 이 같이 얻어진 T<sub>1</sub> 종자의 일부는 박과 작물 형질전환팀에 공급하고 일부는 파종하여 육묘하였다. 3 line에서 각 50주씩 육묘하여 육묘한 식물체를 각line별로 10주씩 박과 작물 형질전환팀에 인계하고 나머지 line별 40주에 시판 바스타를 3 mL/L(일년생 잡초 방제시 적정 사용 농도)를 살포하였으나 저항성을 발현하는 개체를 얻지 못하였다.



그림 2. 수박 형질전환체 T<sub>1</sub> 세대에서의 제초제 저항성 생물검정  
좌: 제초제 살포 전, 우: 제초제 살포 후

1차 접목한 형질전환 line과는 다른 line으로부터 28주의 개체를 획득하여 순화 후 포트에 육묘하였으며 본엽 6-7매 기에 형질전환팀에서 잎 조직을 채취한 후 시판 바스타를 1차 때보다 낮은 농도인 1 mL/L (일년생 잡초 방제 사용 농도의 1/3)을 처리하였으나 1차에서와 같이 제초제 저항성을 발현하는 개체를 선발하지 못하였다.

#### 다. 십자화과 작물

브로콜리는 십자화과작물 형질전환팀으로부터 3년차에 인수한 형질전환 식물체를 포트에 순화 후 10°C에서 10일간의 저온처리로 조기 개화를 유도하여 인공교배에 의해 자식 종자와 비형질전환 식물체의 화분을 이용한 조합종자를 획득하였다. 획득한 후대 종자(T<sub>1</sub> 세대)를 파종하여 포장에 정식하고 1998년 10월 9일에 화구가 출현한 상태에서 시판 “바스타”를 일년생 잡초 방제용 사용농도의 2배인 6 mL/L의 농도로 잎 전면에 고루 살포하고 5일 후에 저항성 발현 식물체를 선발하였다. 바스타 저항성의 발현은 KW13 계통에서 유래한 것으로 자식 후대의 경우 포장에 전개한 16 개체 중 14개체가 저항성으로 나타나 이것을 선발하였으며, 비형질전환 식물체의 화분을 이용한 조합종자에서는 20 개체 중 10 개체가 저항성을 나타내어 선발하였다. 선발한 식물체는 가온 이중플라스틱하우스에 정식하여 개

화를 유도하고 인공교배를 통하여 후대 종자를 획득하였다.

브로콜리 T<sub>2</sub> 10 line에서 제초제 저항성 인자의 동형접합 계통은 선발하지 못하였으며 T<sub>2</sub> 세대 전체의 저항성과 감수성이 100:45로 나타났으며, F<sub>1</sub> 21 line에서는 저항성과 감수성이 110:38로 나타났다.

형질전환 브로콜리 T<sub>2</sub> 세대에서 선발된 개체를 인공교배하여 T<sub>3</sub> 세대를 유기하고 이를 각 50립씩 파종하여 171계통 중에서 제초제 저항성 인자가 고정된 동형접합 67계통을 선발하였다. 선발한 67계통에서 일대잡종의 실용화에 대한 검정을 수행하기 위하여 비형질전환 계통을 자방친으로 하고 제초제 저항성 인자가 고정된 선발계통의 화분을 인공 수분하여 비형질전환 계통과 형질전환 계통간의 일대잡종 종자를 생산하였다. 여기에서 생산된 비형질전환 계통과 형질전환 계통간의 일대잡종 종자를 파종하여 일부는 포트 육묘 상태에서 제초제 저항성의 발현을 검정하였으며, 일부는 토양에 정식하여 제초제 저항성의 발현을 검정하였다. 포트 상에서나 토양



그림 3. 형질전환된 T<sub>3</sub> 브로콜리와 이를 이용한 일대잡종의 제초제 저항성을 이용한 종묘 순도 향상에의 이용

(앞줄 우: 비형질전환 계통, 가운데줄 F<sub>1</sub>: 형질전환 계통과 비형질전환 계통간의 일대잡종 개체, 뒷줄 상: 형질전환 후대 계통)



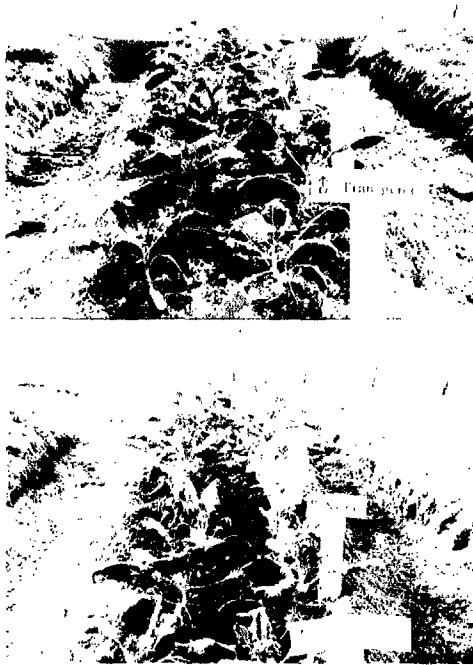


그림 4. 형질전환된 T<sub>3</sub> 브로콜리와 이를 이용한 일대잡종의 포장에서의 제초제 저항성을 이용한 종묘 순도 향상에의 이용  
 상: 제초제 살포 전, 하: 제초제 살포 후  
 (♂: 형질전환 후대 계통 ♀: 비형질전환 계통 F<sub>1</sub>: 형질전환계통과 비형질전환 계통 간의 일대잡종 개체)

재배 상에서 동일하게 비형질전환 계통과 형질전환 계통간의 일대잡종 식물체가 제초제에 안정적으로 저항성을 나타내었다. 이로써 제초제 저항성 유전자를 형질전환을 통하여 목표 작물 내에 도입하고 제초제 저항성 유전자가 도입된 계통을 부계친으로 사용하여 일대잡종 종자를 생산하는 경우 일대잡종 세대에서 제초제 저항성이 발현되고 이를 이용하여 일대잡종 종자의 순도 검정이 가능함이 입증되었다.

# 제 6 장 RAPD 분자마커를 이용한 종묘순도 검정법 개발 및 실용화 연구

## 제 1 절 서 설

종자순도 검정의 목적은 생산된 고추 종자를 생산한 농가별로 유전적 순수성을 조사하여 일정 수준 이상의 타 품종 종자가 혼입된 것으로 판명 되면 이를 폐기처분하여 종자사고를 미연에 방지하는 것이다. 현재 일대 교잡종 고추 종자에 유전적으로 불순한 종자가 혼입되는 원인은 주로 음성 불입성의 불완전, 환경의 영향 및 채종포 관리자의 부주의 등으로 인하여 자가수정된 종자, 부계친으로부터의 채종, 타화분에 의한 오염 수분 및 타 품종 종자의 기계적인 혼입 등에 의한 것이다. 특히 최근에 해외 채종이 증가하면서 종자 품질 관리가 한층 더 중요하게 되었다.

채소종자 순도 검정의 관행적인 방법은 여러 가지인데, 그 중에서도 가장 보편적인 것은 실제 포장 생육 검정방법이다. 이 방법의 장점은 검사 결과의 확실성이지만 단점으로는 시간과 경비가 과다하게 소요되는 것이다. 이러한 결점을 보완하기 위하여 1960년대 이후로 동위효소 분석법이 채소 종자의 순도검정법에 비교적 광범위하게 이용되기 시작하였다. 그러나 이 방법의 문제점은 다형성에 한계가 있고 환경의 영향에 민감하여 불순 종자의 검색 가능성과 재현성이 낮다는 것이다.

최근 분자생물학의 발달로 DNA를 분자표지로 이용하여 품종을 구별하는 방법이 개발되었다. 이에는 여러 가지 방법이 있는데, 종자순도검정에 많이 쓰이는 방법은 restriction fragment length polymorphism (RFLP)과 random amplified polymorphic DNA (RAPD)이다. 이 RFLP는 DNA를 제한효소로 절단하여 생기는 다형성을 품종간의 차별화에 이용하는 것이다. 이 RFLP 방법은 위의 동위효소 방법보다는 품종간 구분 능력이 높은 장

점을 갖고 있으나 고순도의 DNA가 다량 필요하며 기술이 복잡하고, 방사성 동위원소를 사용해야 하는 등 일반 종묘회사에서 실용적으로 종자순도 검정에 사용하기에는 부적합하였다. RAPD 방법은 임의의 primer로 polymerase chain reaction (PCR)을 이용하여 특정한 DNA 단편을 대량으로 증폭하여 생기는 다형성을 이용하는 것이다. 이 RAPD 방법은 RFLP 방법과 비교해 보면 순도검정에 필요한 DNA 양이 소량이며, 동위원소를 사용할 필요가 없고, 분석 과정이 단순한 것 등이 장점이다. 그러나, 이 RAPD 방법도 다량의 종자에 대한 순도 검정에 경제적으로 이용하기에는 개선해야 할 점이 많다.

그리하여 본 연구의 목적은 현행 RAPD 방법의 여러 문제점들을 획기적으로 개선하여, 국내 민간 종묘회사가 실제적으로 RAPD 방법을 고추 일대교잡품종의 종자순도검정에 사용할 수 있는 일련의 검정방법을 개발하는 것이다. 이를 위해서는 새로운 종자순도 검정방법은 유전적으로 불순한 종자를 구별할 수 있는 정확성, 반복된 검사에서 동일한 결과를 얻을 수 있는 재현성, 일회 검사에 소요되는 시간이 적은 신속성, 검사에 소요되는 경비가 적은 경제성, 검사 수행에 요구되는 숙련도가 낮은 편의성, 종합적으로 본 기술의 수요자에 의한 실제 이용가능성인 실용성 등의 면에서 기존의 방법들보다 월등히 우수하여야 할 것이다. 본 연구에서는 우선 순도검정의 경제성과 신속성을 향상시키기 위하여 시료로부터 DNA를 추출하는 방법을 40시료당 약 24시간 정도 소요되는 CTAB 방법이나 Yu 방법 대신에 불과 1시간 이내에 필요한 양과 질의 DNA를 추출할 수 있는 NaOH 방법을 실용화하고자 하였다. 다음으로 정확성, 재현성, 신속성 및 편의성을 향상하기 위하여 현행에서의 전기영동과정을 생략할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다. 이를 위해서 random primer 대신에 sequence tagged site (STS) primer의 이용가능성을 탐색하고자 하였다. 끝으로 본 연구에서 개발된 일련의 방법들에 대한 실용성을 검증하기 위하여 임의로 혼입된 고추 종자를 대상으로 blind test를 수행하였다.

## 제 2 절 연구개발 내용

### 1. RAPD에 의한 품종 특이 마커 탐색

#### 가. 연구 재료 및 방법

##### 1) 식물재료

본 실험에서는 중앙종묘(주)에서 세포질유전자적 옹성불임성(CGMS)을 이용하여 육성한 '대명' 품종과 그의 양친, 유전자적 옹성불임성(GMS)을 이용하여 육성한 '광복' 품종과 그의 양친을 공시재료로 하였으며, 각 품종의 종자, 떡잎과 본엽을 분양받았다. 또한 blind test에 사용된 시료는 중앙종묘(주)에서 임의로 조제한 것으로 잎과 종자였으며, 이 시료에는 F<sub>1</sub> 종자, 부계 종자, 제 3의 종자가 섞여 있었다. 실제 순도검정에 사용된 시료는 해외시험포에 실제 재배하여 순도검정을 실시하고 있는 개체의 잎을 수거하여 공수해 온 것이었다.

##### 2) 고추의 genomic DNA 추출

위와 같이 준비한 시료로부터 CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)을 이용한 방법 (Jones, 1953; Doyle and Doyle, 1990)과 Yu의 방법 (Yu and Pauls, 1994), NaOH 법 (Wang 등, 1993)을 이용하여 DNA를 추출하였다.

##### 3) RAPD 조건

앞의 과정을 통해 준비한 DNA를 재료로 이용하였다. Primer로는 UBC primer #100-#200, #300-#400과 #700-#790을 이용하였다. PCR 반응은 반응량은 25  $\mu$ l, template DNA는 20 ng (NaOH 방법은 1-2 ng), primer는 200 nM primer, dNTP는 200  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub>은 3 mM을 넣었고, 증폭효소로는 한국생공에서 생산한 Taq Polymerase 1.0 unit를 이용하였다.

Thermalcycler는 화인사에서 제작된 Water bath type을 이용하였고, 94℃에서 4분동안 first full denaturation을 하고, 94℃ 1분, 36℃ 1분, 73℃ 1분 30초의 과정을 45회 반복 후 73℃에서 최종 증폭을 5분간 수행한 후 반응을 완료하였다. 반응이 완료된 시료들은 1.5% agarose gel에서 전기 영동을 실시하였고, UV transilluminator에서 실험결과를 확인하였다.

## 나. 연구결과 및 고찰

### 1) 모계 특이 RAPD 표지의 선발

#### 가) 대명 품종의 모계 특이 표지 선발

대명 품종의 모계는 UBC primer #336에서 약 700bp, #170에서 1300 bp의 특이 밴드를 나타냈다(그림 1). 그러나, #336의 밴드는 F<sub>1</sub> 식물체에서도 안정적으로 나타난 반면(그림 2) #170에서의 밴드는 F<sub>1</sub>에서 안정

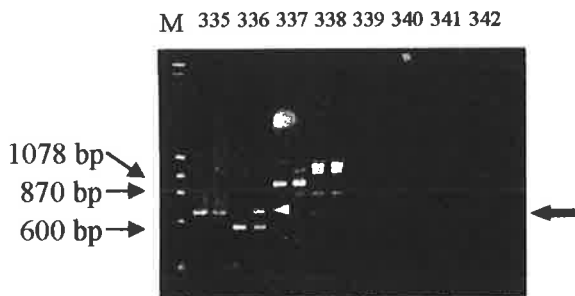


그림 1. 대명 품종의 모계 특이 마커 (#336)

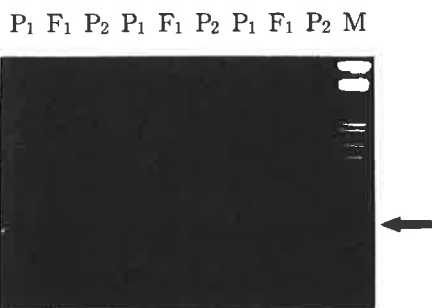


그림 2. 대명 품종 모계 특이 마커의 안정적인 발현

적이지 않았으며, 따라서 대명 품종의 모계 특이 마커로는 #336으로 나타난 700 bp의 밴드를 이용하였다.

나) 광복 품종의 모계 특이 표지 선발

광복 품종에서는 UBC primer #106에서 570 bp의 특이 밴드를 발견하였다. 그러나, 이 밴드는 primer의 농도가 낮아지면 나타나지 않아 안정적인 특이 밴드로 이용하기에는 무리가 있다고 판단하였다.

2) 부계 특이 RAPD 표지의 선발

가) 대명 품종의 부계 특이 표지 선발

대명 품종의 부계에서는 UBC primer #127에서 800 bp, #147에서 850 bp의 특이 밴드를 찾을 수 있었다(그림 3). #147에서 발견된 밴드는 재현성이 매우 높았으며, F<sub>1</sub>에서도 안정적으로 나타나는 것을 확인할 수 있었다(그림 4).



그림 3. 대명 품종의 부계 특이 표지 (#147)

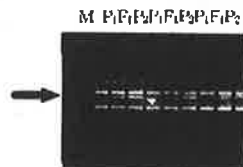


그림 4. 대명 품종의 부계 특이 표지의 안정적인 발현

나) 광복 품종의 부계 특이 표지 선발

광복 품종의 부계에서는 #774에서 1200 bp, #302에서 1380 bp의 특이 밴드를 찾을 수 있었다(그림 5). 이들은 F<sub>1</sub> 식물체의 DNA를 시료로 이용하였을 때에도 안정된 재현성을 보였으며, 따라서 품종 특이적 마커로서 이용이 가능하다고 사료되었다(그림 6).

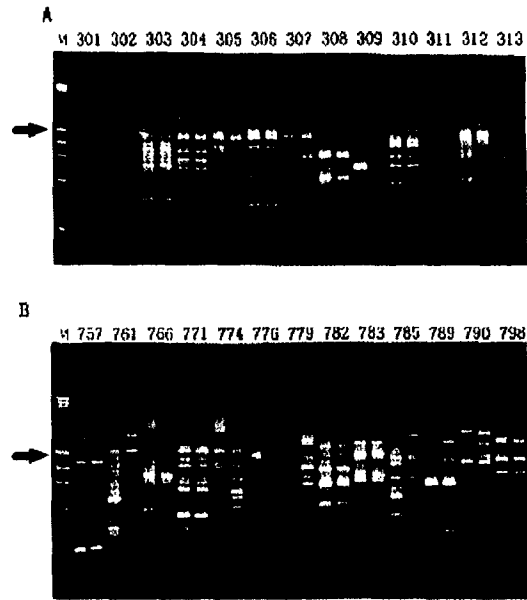


그림 5. 광복 품종의 부계 특이 마커 (A: #302, B:#774)

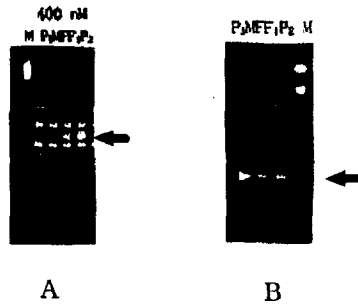


그림 6. 광복 품종의 부계 특이 마커의 안정적인 발현 (A:#336, B:#774)

## 2. 품종 특이적 STS primer의 제작 및 특이 밴드 확인

### 가. 연구재료 및 방법

#### 1) 품종 특이 마커의 DNA 염기서열 결정 및 분석

품종 특이 밴드를 agarose gel 상에서 잘라낸 후 DNA를 분리하여 Promega 사의 pGEM-T vector에 insert하였다. blue/white 방법으로 insert된 clone을 확인한 후 sequencing에 사용하였다. sequencing은 UBC 사의 sequence kit 2.0을 이용하여 수행하였다.

#### 2) STS primer의 제작 및 특이 밴드 확인

특이 밴드의 양쪽 끝부분으로부터 염기서열을 결정한 후 sense strand와 결합하는 primer와 antisense strand와 결합하는 primer를 각각 24-mer, 18-mer, 15-mer, 12-mer로 제작하였다. 이들 primer를 이용하여 품종 특이적 밴드가 단일 밴드로 나타나는지를 확인하였다.

5'GCCACGGAGAAGGTGAGGTTGATTAGAGAAAGGTTGAAGACAGCTCA  
GAGTCGTAAAGAGTCATACGCCAATGTGAGGACAAGGGATCTTGAGTTT  
GAGATGGATGACTAGGTGTAGTTGATGATTTACCCATGAAAGTGGTGA  
AGAGGTTTGGTAGAAATGGTAAGCTTAGTCACCGTTATGTTGGCCCGTA  
TAGAGTTTTGAGCCATGTTGGGAAAGTATCCTATGAAGTTGAGTTGCC  
GAGTTGTCATCTATTCATCCTATTTTTACGTCCTCCATGCTTAAAAAGCA  
TATTAGTGATTCCGTTGTAGTGGATCCTCAAAGAGTGCTAATATTC  
ACTAATATTTCTTCTATGATATTCTTGTTGAGATTCTAGACATCCAGA  
TCCATAAGCAGAGGAAAAAGGAGGTTCCCTTGGTCAAAGTTTTGAGGTG  
GAACTAGTCAGTTAAGGGCGCTACTTTGGAGGCAGTAGCAGACAGGCGAG  
CCAAGTACACACCTCTCTCCATGAGTTCAGATCAAGCCGAAGTTTTT  
ATTCTTCTTAGTTCATCCCTTCTAATCTAAAGTTCAGCTATGTATCTAT  
TCTTACATAAGTTCTTGTAATTTCCGAAGTATTCAAGAGTTAGAAAGC  
TATGGAGCCCACCTTAGAAAATTTCTTTAGGTATGTGTACTTAGTGTTT  
CGTGGC 3'

그림 7. 대명 모계 특이 밴드의 염기서열



## 나. 연구결과

### 1) 양친 특이 밴드의 염기서열 결정 및 분석

#### 가) 대명 모계 특이 밴드의 염기 서열

#336에 의해 나타난 대명 품종의 모계 특이 밴드는 총 693 nucleotide로 구성되었으며(그림 7), Genebank의 데이터베이스를 통해 검색한 결과 *Nicotiana glauca*의 retrotransposon, *Lycopersicon peruvianum*의 자가불화합성 유전자 등 여러 유전자의 일부와 유사성이 존재하였다. 그러나, 이 밴드의 염기서열을 아미노산 배열로 번역한 결과 여러 곳에 stop codon이 존재하여 특정한 단백질을 만들지는 못하는 것으로 해석되었다.

#### 나) 대명 부계 특이 밴드의 염기 서열

#147에 의해 나타난 대명 품종의 부계 특이 밴드는 총 845

```
5'GTGCGTCCTCTTAGTAATTTTGTTATCTCAGCCATTCGGTAGTCTT
CTCTCCTGTGTTGGTCGGAGCCTGATATTCCAGCCAATATAAGAATCTAC
CAATAGTTTGGGGAGAGATGTCAACTTAACCTCCTCGAATCATAAGGTA
GGTGATAGGTTCAACCACCTTTCATAACTACCCCTGTGGATACTGCCTCT
ACAGCTCTCCTTGTAGGCTGTGGAACATCATACTAGGATCTTACTATAT
CTACCGAGTGCACCCATAATCTACCTAAATCCATGATTCCTGAAGTAATC
TTTAAACTCGGGTAATGGAACATTACTATATTAGTTCCTATTTTATCT
GGATATGGCACCTTTTTTATCTTACCTCTCGGTAGGTAGAACAGCCCCGT
GTTAAATATCTCCTATATGTTGGGGATCCCCATTATCAACAATGGGA
ATCGGAGCAGTGGTCAATATGAGTGGGGGGGTCTTGTCTGTCTATTGGGG
TAGCATATACCTGGCGACCCTGAACTTCTCTGAAATATCATCTACTGAA
CCAGATTCATCTTCATCATCACCATCGCCATTAGCCGACTATGGTGTGTG
GGGAGGAGAAATAGTCATATTCTTTCTTCTCAACACCTTTGGTGGTGGTG
TTTCAGACTCTTGGGGAATCACTTTCTTCCCCTTAGCTTTAGCTGGTGCT
TTCCFTTTTTATCTATTTTCATTATTGAGGTTCCATCAAATCTTCTCT
GCTTCTCTCAGATAGTTACTCATAACAGAAACAATGGTTACCTCACTTT
CAACTAGTGCTTATTTGTCCCCTTTTAGCAATTGTTTTTTATGAGGAC
GCAC 3'
```

그림 8. 대명 부계 특이 밴드의 염기서열

표 1. 대명 모계 특이 primer의 염기서열 및 GC content, melting temperature

Name	sequence	GC content	T <sub>m</sub>
DMM-1	5'GCCACGGAGACACTAAGTACACAT3'	12/24	72°C
DMM-2	5'GCCACGGAGAAGGTGAGGTTGATT3'	13/24	74°C
DMM-3	5'GCCACGGAGACACTAAGT3'	10/18	56°C
DMM-4	5'GCCACGGAGAAGGTGAGG3'	12/18	60°C
DMM-5	5'GCCACGGAGACACTA3'	9/15	48°C
DMM-6	5'GCCACGGAGAAGGTG3'	10/15	50°C
DMM-7	5'GCCACGGAGACA3'	8/12	40°C
DMM-8	5'GCCACGGAGAAG3'	8/12	40°C

nucleotide로 구성되어 있으며(그림 8), Genebank의 데이터베이스를 통해 검색한 결과 *Dictyostelium discoideum*의 plasmid 유전자, *Anopheles gambiae*의 마이토콘드리아 유전자들의 일부와 유사성이 존재하였다. 그러나, 아미노산 배열 분석 결과 대명 모계 특이 밴드에서처럼 특정한 단백질을 만들지는 못하는 것으로 생각되었다.

## 2) STS primer 제작

### 가) 대명 모계 특이 STS primer 제작

염기서열을 토대로 대명 모계 특이 마커에 대한 4쌍의 primer를 제작하였다(표 1). 이들을 모두 조합하여 PCR 반응을 시킨 결과 DMM-1과 DMM-8을 이용하여 annealing 온도를 56°C로 반응시켰을 때 모계 특이 표

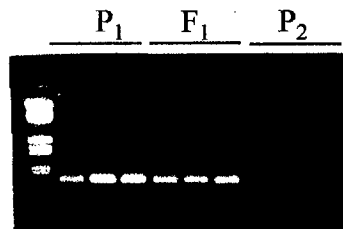


그림 9. DMM-1과 DMM-8 대명 모계 특이 primer에서 나타난 단일 밴드

표 2. 대명 부계 특이 primer의 염기서열 및 GC content, melting temperature

Name	sequence	GC content	T <sub>m</sub>
DMP-1	5'GTGCGTCCTCATAAAAAACAATTG3'	12/24	72°C
DMP-2	5'GTGCGTCCTCTTAGTAATTTTCT3'	13/24	74°C
DMP-3	5'GTGCGTCCTCATAAAAAA3'	10/18	56°C
DMP-4	5'GTGCGTCCTCTTAGTAAT3'	12/18	60°C
DMP-5	5'GTGCGTCCTCATAAAA3'	9/15	48°C
DMP-6	5'GTGCGTCCTCTTAGT3'	10/15	50°C
DMP-7	5'GTGCGTCCTCAT3'	8/12	40°C
DMP-8	5'GTGCGTCCTCTT3'	8/12	40°C

지로서의 단일 밴드가 가장 명확히 나타났다(그림 9).

나) 대명 부계 특이 STS primer 제작

대명 모계 특이 STS primer와 같은 방식으로 4쌍의 primer를 제작하여(표 2) PCR한 결과 DMP-1과 DMP-2 짝에서 annealing 온도와 관계 없이 안정적인 단일 특이 밴드를 볼 수 있었고, DMP-3/DMP-4의 조합에서도 57°C로 annealing하여 반응시킨 결과, 안정적인 단일 특이 밴드를 볼 수 있었다(그림 10).

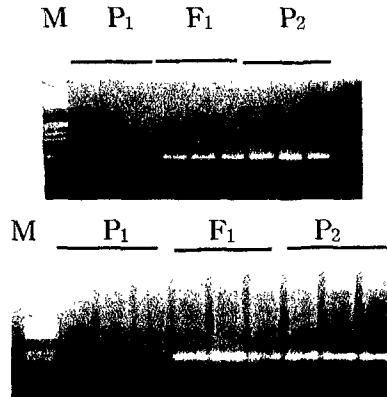


그림 10. STS primer를 이용한 대명 부계 특이 단일 밴드  
 상: DMP-1과 DMP-2를 이용한 단일 밴드  
 하: DMP-3과 DMP-8을 이용한 단일 밴드

### 3. PCR을 이용한 종묘 순도 검정법의 실용화

#### 가. 연구재료 및 방법

##### 1) DNA 추출과정에서의 생력화를 통한 PCR 이용 종묘 순도 검정법의 실용화

###### 가) NaOH를 이용한 DNA 추출법의 실용성 검정

기존의 DNA 추출법으로는 CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)을 이용한 방법 (Jones, 1953; Doyle and Doyle, 1990)과 Yu의 방법 (Yu and Pauls, 1994)을 사용하였고, NaOH를 이용한 방법(Wang 등, 1993)을 이용하여 DNA를 추출하는 방법은 다음과 같다. 떡잎(10-12mg) 혹은 종자 1립(부게 약 6-8 mg)을 1.5 ml microtube에 넣고 mg 당 10  $\mu$ l의 0.5 N NaOH를 첨가한 다음 균일하고 잘게 마쇄하였다. 5  $\mu$ l씩 새 tube에 넣고 100 mM Tris (pH 8.0)로 10배, 100배, 200배, 1000배로 희석하였다. 잘 섞은 다음 1  $\mu$ l를 PCR 반응에 이용하였다.

##### 2) 전기영동과정의 생략을 통한 PCR 이용 종묘순도검정법의 실용화

###### 가) Multi-well plate를 이용한 실용화

PCR 산물 (25  $\mu$ l)을 multiwell plate로 각각 옮긴 다음 1  $\mu$ g/ml의 EtBr을 1  $\mu$ l 첨가하였다. 형광발현은 10분 후에 UV transilluminator로 관찰하였다.

###### 나) Tube를 이용한 실용화

새 tube로 PCR 산물(25  $\mu$ l)을 옮긴 후 ethanol precipitation을 시킨 다음 70% ethanol로 씻고 건조시킨 DNA를 다시 25  $\mu$ l의 증류수에 녹였다. 여기에 1  $\mu$ g/ml의 EtBr을 1  $\mu$ l 첨가하였다. 형광발현은 10분 후에 UV transilluminator로 관찰하였다.

다) Pellet painting을 이용한 실용화

2  $\mu$ l Pellet painting Co-precipitant (Novagen)와 0.1 volume의 3 M sodium acetate를 첨가한 후 2 volume의 ethanol을 넣고 실온에서 2분 기다린 후 14,000 g에서 16,000 g로 5분 동안 원심분리하였다. 상등액을 피펫 끝으로 제거한 후 2 volume의 70% ethanol로 씻은 다음 원심분리하였고, 또 한번 100% ethanol로 씻은 다음 원심분리하였다. Pink pellet으로 남은 DNA를 증류수나 TE buffer에 녹이고 관찰하였다.

## 나. 연구결과

### 1) DNA 추출과정에서의 생력화를 통한 PCR 이용 종묘 순도 검정법의 실용화

가) NaOH를 이용한 DNA 추출법의 실용성 검정

표 3에서 보는 바와 같이 NaOH를 이용하여 DNA를 추출하는 방법은 간단한 PCR을 수행할 때 매우 실용적인 방법으로서, CTAB에 의해 추출하는 방법이나, Yu의 방법에 비해 소요되는 시간과 인력, 경비가 매우 적은 방법이다. DNA 추출에 있어서 단계가 간단한 경우 불순물이 많아 PCR 반응에 영향을 미칠 것으로 우려되었으나 실제 PCR 결과 세 방법간의 큰 차이를 발견하지는 못하였다(그림 11). 또한 STS primer를 이용하여 단일 밴드의 유무를 관찰할 경우에도 다른 방법과 차이가 없었다(그림 12). 따라서, NaOH를 이용한 DNA 추출방법은 RAPD 마커를 이용한 종묘 순도 검정법을 실용화하는데 있어 시간과 노력과 경비를 줄이는 데 큰 도움이 된다고 생각한다.

NaOH에 의한 DNA 추출방법은 시료로 본엽을 사용하였을 경우만이 아니라 자엽이나 종자를 사용할 경우에도 같은 PCR 결과를 보였으며, DNA를 추출하는 NaOH의 농도는 0.3N-0.7N이 적합했다. Tris·HCl의 희석배수는 100배 이상이 적합했는데, 10배로 희석한 경우에는 PCR의 증폭이 전혀 없었다. Tris·HCl로 100배 희석했을 경우의 DNA 농도는 1-2

표 3. DNA 추출 방법에 따른 40개의 표본에서 DNA를 추출 소요 시간과 노력 비교

	CTAB method	Yu method	NaOH method
Total extraction time <sup>2</sup>	More than 24 hours	18 hours	less than 1 hours
Main steps	1. Homogenization using liquid nitrogen 2. Incubation at 65°C 3. Ultracentrifugation 4. Precipitation 5. Storage at -70°C 6. Drying 7. RNase treatment 8. Phenol, chloroform extraction	1. Homogenization (buffer) 2. Incubation at 65°C 3. Ultracentrifugation 4. Storage at -70°C 5. Drying	Homogenization (buffer)
Reagents	1. Extraction buffer (CTAB, Tris-HCl, NaCl, EDTA, and 2-mercaptoethanol) 2. Isopropanol 3. EtOH	1. Extraction buffer (Tris-HCl, NaCl, EDTA, and SDS) 2. Isopropanol 3. EtOH	1. Extraction buffer (0.5N NaOH, and Tris-HCl)
Equipments and Tools	1. 50ml tube 2. 1.5ml tube 3. 5ml blue, yellow tip 4. Mortar 5. Water bath 6. Centrifuge, microcentrifuge 7. -70°C freezer	1. 1.5ml tube 2. Blue, yellow tip 3. Pestle 4. Water bath 5. Microcentrifuge 6. -70°C freezer	1. 1.5ml tube 2. Blue, yellow tip 3. Pestle
Minimum sample size	2-3g of leaf	20-50mg of leaf	1 seed, 1-50mg of leaf
DNA conc.	50-289ng / $\mu$ l	2-13 ng / $\mu$ l	0.3-6 ng / $\mu$ l

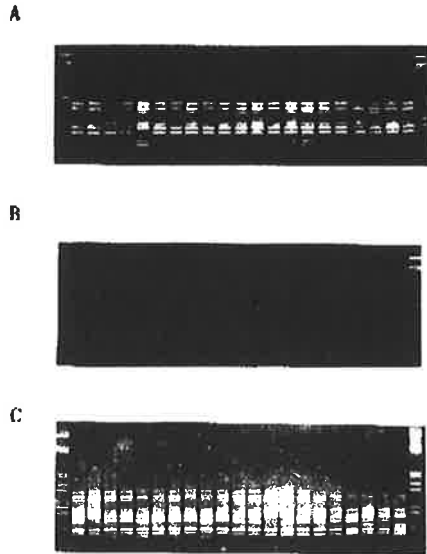


그림 11. DNA 추출 방법 간의 RAPD 결과 비교  
 A: CTAB 방법 B: Yu 방법 C: NaOH 방법

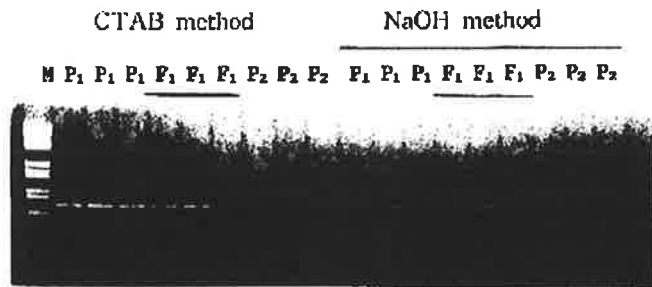


그림 12. DNA 추출 방법 간의 STS primer에 의한 PCR 결과 비교

ng/ $\mu$ l 범위였다.

단, NaOH를 이용하여 DNA를 추출할 경우에는 사용하는 NaOH 용액을 되도록 신선하게 사용하여야 하며, 특히 NaOH로 DNA를 추출한 후 Tris·HCl로 희석하는 과정을 한 시간 이내에 진행하도록 하는 것이 중요했다.

그리고, DNA 추출 원액을 희석하는 Tris·HCl은 삼차증류수로 대체가 가능하였다. NaOH로 추출한 DNA는 -20°C에서 보관할 경우 10개월 이후에도 같은 PCR 결과를 나타냈다.

따라서, PCR 방법을 이용한 종묘순도검정에서 NaOH를 이용하여 DNA를 추출하는 것은 매우 실용적인 일로 생각한다.

## 2) 전기영동과정의 생략을 통한 PCR 이용 종묘순도검정법의 실용화

PCR 산물을 확인하는 단계로서 전기영동과정은 DNA 표지를 이용한 종묘 순도 검정에서 필수적인 단계이다. 그러나 기존에 행해졌던 전기영동을 통한 gel에서의 확인방법은 시간이 오래 걸리고 비용이 많이 드는 단점을 갖고 있으므로 PCR을 이용한 종묘 순도 검정의 실용화를 위해서는 보완해야 할 단계이다.

따라서, STS primer를 이용하여 특이밴드 하나만을 증폭시킨 후에 곧바로 결과를 확인할 수 있는 몇 가지 방법을 개발하였다.

### 가) Multi-well plate를 이용한 실용화

PCR 산물을 multiwell plates에 넣고 EtBr과 반응시켜 발현되는 형광반응을 UV illuminator에서 관찰하는 것으로 P<sub>2</sub>와 F<sub>1</sub>에서 뚜렷한 형광을 육안으로 확인할 수 있었다.

### 나) Tube를 이용한 실용화

증폭된 특이밴드를 포함하는 PCR tube에 직접 EtBr을 넣고 증폭시



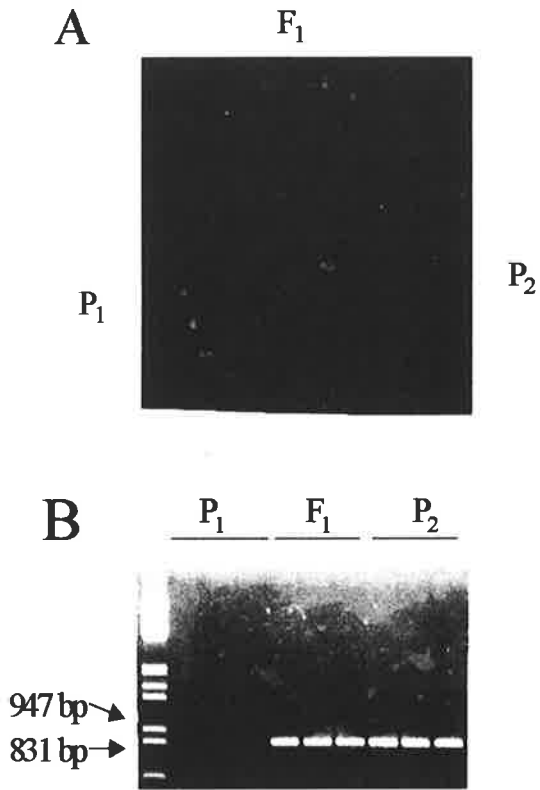


그림 13. 대명 부계 특이 STS primer로 증폭한 PCR 산물의 tube 내에서의 형광 발현과 같은 PCR 산물의 전기영동 결과  
P<sub>1</sub> : 대명 모계, F<sub>1</sub> : 대명, P<sub>2</sub>: 대명 부계

킨 후에 형광반응을 육안으로 확인하는 것으로 그림에서 보듯이 F<sub>1</sub>과 P<sub>2</sub>에서 증폭된 DNA의 존재를 확실히 확인하였다(그림 13).

#### 다) Pellet painting을 이용한 실용화

DNA 유무를 확인하는 시약인 Pellet Painting을 이용하여 PCR product의 증폭여부를 확인한 결과 부계특이 STS primer를 이용한 PCR product중 부계와 F1에서만 분홍색의 pellet을 육안으로 확인할 수 있었다(그림 14).

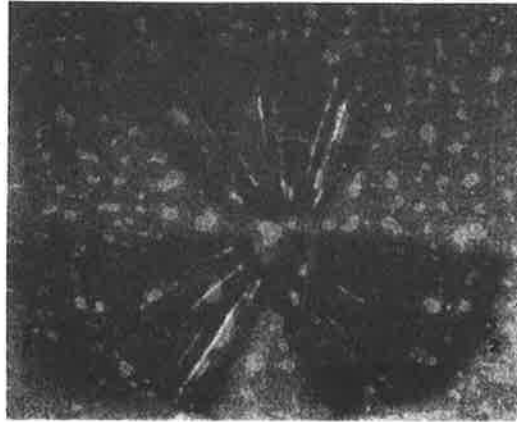


그림 14. 대명 STS primer를 이용한 PCR 증폭 산물의 pellet painting 방법에 의한 확인 (증폭된 DNA가 분홍색 pellet으로 나타남)

P<sub>1</sub> : 대명 모계, F<sub>1</sub> : 대명, P<sub>2</sub> : 대명 부계

#### 4. PCR을 이용한 종묘 순도 검정법의 실제 응용

##### 가. 연구재료 및 방법

##### 1) UBC primer를 이용한 blind test

중앙종묘(주) 해외 포장에서 채종한 종자 중 농가의 채종 환경이 불량하여 타 종자의 혼입이 의심스러운 종자 lot에서 80개체씩 2번 시료를 채취하여 UBC primer #336으로 검정하였다.

##### 2) STS primer에 의한 blind test

중앙종묘(주) 육종연구소에서 모계 종자 200개와 부계 본엽 200개의 시료를 양도받아 타 종자의 혼입을 검정하고 PCR을 이용한 종묘 순도 검정 방법의 정확도와 효율을 분석하였다.

##### 나. 연구결과

##### 1) UBC primer를 이용한 blind test

80개체씩 2번 시료를 채취한 중에 첫 번째 군에서는 UBC primer #336으로 검정한 결과 14개의 이형주가 발견되었고(그림 15), 두 번째 군에서는 6개의 이형주가 발견되었다(그림 16). 이는 중앙종묘(주) 육종연구소에서 이들 개체들에 대해 관행 방법으로 조사한 결과와 일치하였다.

## 2) STS primer에 의한 blind test

모계 종자 200개를 분석할 때에는 모계 특이 primer인 DMM-1/DMM-8, DMM-3/DMM-8 조합을 사용하였다. PCR mixture에 EtBr을 포함하여 PCR 반응을 진행하고 tube에 UV를 조사한 결과 이형주를 발견할 수 있었다(그림 16).

부계 본엽 200개를 분석할 때에는 부계 특이 primer인 DMP-1/DMP-2, DMP-3/DMP-4를 사용하여 검정하였다. 부계 본엽을 검정한 결과 전기영동을 거친 경우에는 100%의 정확도를 보였으나, 전기영동을 거치지 않고 tube에서만 발현을 본 경우에는 그렇지 못했는데, 이것은 혼입된 종자에서 부계 특이 primer에 의해 증폭은 되지만 밴드의 크기는 다른 다른 밴드가 존재하였기 때문이었다(그림 17). 이러한 blind test 결과는 중앙종묘(주) 육종연구소의 분석시료 구성 결과와 정확히 일치하였으며, 부계 특이 primer를 이용하여 다른 밴드가 관찰된 개체는 중앙종묘(주) 육종연구소에서 종묘 순도 검정 효율을 조사하기 위해 일부러 혼입한 완전히 다른 일대교잡종 종자로 밝혀졌다.

대부분의 채종 과정에서 다른 품종이 가까운 거리에서 격리되지 않고 재배되는 일은 없기 때문에 이번의 경우처럼 완전히 다른 종자가 혼입되는 일은 매우 드문 일이며, 따라서 PCR을 이용한 실용적인 종묘 순도 검정 체계로서의 이 방법은 매우 효율적이고도 실용적인 방법이라고 생각한다.

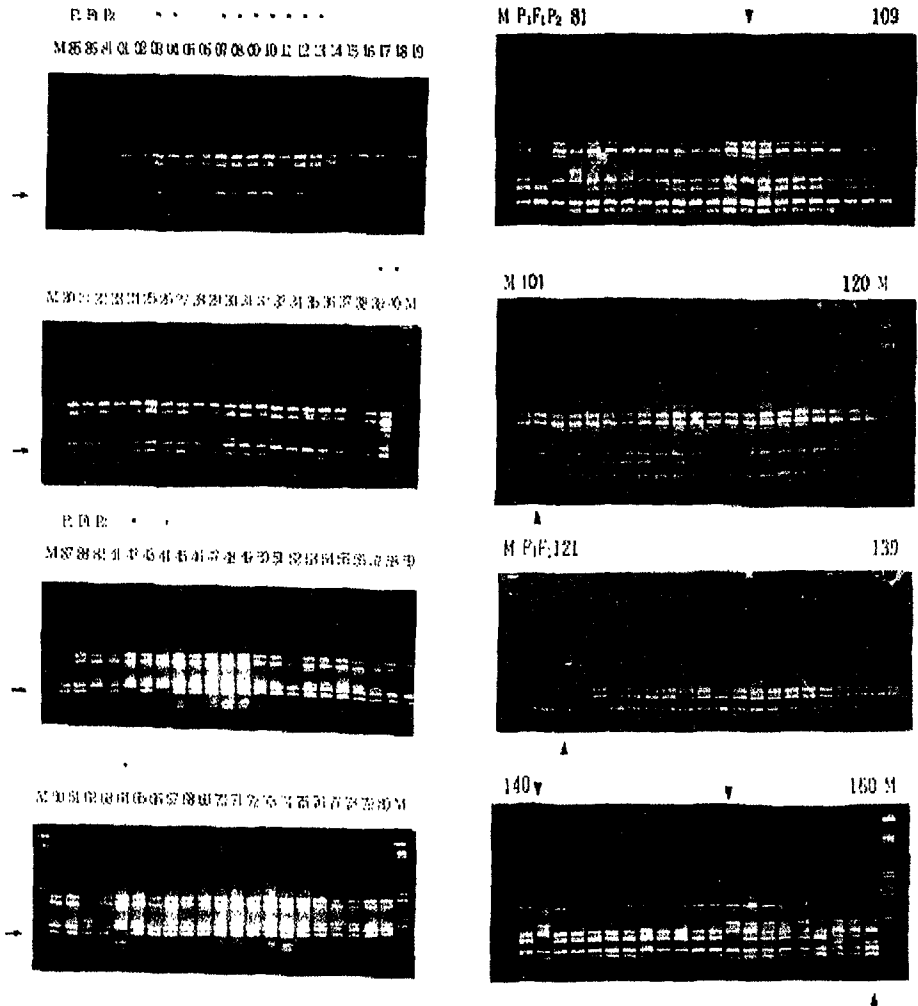


그림 15. UBC primer를 이용한 종묘순도 검정

좌: 제 1 그룹 검정 우: 제 2 그룹 검정

\*, ▲, ▼는 이형주를 나타냄



그림 16. STS primer를 이용한 대명 모계 순도 검정  
 화살표로 표시된 형광반응을 보이지 않는 개체가 이형주



그림 17. STS primer를 이용한 대명 부계 순도 검정  
 화살표로 표시된 개체는 혼입종자로서 대명 부계 특이 밴드와는  
 다른 밴드가 증폭됨.

### 제 3 절 연구 요약 및 고찰

본 연구는 고추 일대교잡종 종자의 품질 향상을 위하여 국내외에서 생산된 종자들에 대한 유전적인 순도를 검정하는 방법을 개선하는 것을 목표로 수행하였다. 따라서, 본 연구에서 추구한 순도검정법은 기존방법에 비하여 불순 종자를 더 정확히 판별할 수 있고, 재현성이 높아야 하며, 검정에 소요되는 시간이 보다 짧고, 검정에 고도의 숙련된 기술이 필요하지 않으면서도 민간종묘회사가 실제적으로 사용가능한 방법이었다.

본 연구에서는 고추종자의 순도검정을 위해 본 연구과제 초기에 개발되어 사용되기 시작한 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 방법을 앞에서 제시한 기준에 맞추어 개선하려 하였다. RAPD는 다른 분자표지 개발 방법에 비해 비용과 시간, 노력 면에서 가장 접근이 쉬운 방법이며, 따라서 현재까지도 저비용으로 실용적인 분자표지를 찾으려 할 때에 가장 많이 이용되는 방법이다.

양친 특이 표지를 찾기 위해서 UBC decamer primer 300개를 사용하여 RAPD profile을 조사한 결과 ‘대명’ 품종의 경우 모계 특이 밴드 1개, 부계 특이 밴드 1개, ‘광복’의 경우에는 모계 특이 밴드 1개, 부계 특이 밴드 2개를 찾았다.

친특이 밴드가 random primer 300개를 사용하였을 때 5개로 예상보다 적게 나타났는데, 이에 대해서는 전기영동법과 염색방법 등을 silver staining이나 low temperature gel agarose의 사용, polyacrylamide gel이나 DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)로 바꾸어 좀 더 미세한 bp의 차이도 감지할 수 있도록 하거나, 품종 특이 마커 자체는 고추나 다른 작물에서 polymorphism의 형성이 좋다는 AFLP 방법으로 개발하고 이를 STS marker로 전환하는 것이 좋을 것으로 보인다.

위에서 개발된 RAPD 표지의 정확성과 재현성을 향상시키기 위해 random primer를 바탕으로 대명의 모계 특이 밴드와 부계 특이밴드의 염기서열을 결정하였고, 이 밴드들의 양끝 염기서열을 이용하여 STS

primer를 제작하였다. 이를 이용하여 PCR한 결과 모계 특이 표지의 primer로는 DMM-1 (24-mer)와 DMM-8 (12-mer) 및 DMM-3 (18mer)와 DMM-8이 쓰일 수 있었고, 부계 특이 표지의 primer로는 DMP-1 (24mer)과 DMP-2 (24mer) 및 DMP-3 (18mer)와 DMP-4 (18mer)가 쓰일 수 있었다. 이와 같이 개발한 STS primer를 이용하면 단일 친특이 밴드만이 증폭되므로 PCR 과정에서나 그 직후에 DNA 염색시약을 사용하여 전기영동과정 없이 tube 또는 multiwell plate에서 종자의 순도검정을 할 수 있었다. DNA 추출과정에서도 NaOH를 이용하면 간단하면서도 실용적으로 DNA를 얻을 수 있었으며, 이를 통해 RAPD를 이용한 종묘 순도 검정 체계를 세울 수 있었다.

본 연구에서 개발한 체계가 기존의 RAPD 이용방법에 비해 실용적일 수 있었던 이유는 크게 세 가지로 볼 수 있다.

먼저 DNA 추출 방법의 간략화에 그 첫 번째 이유가 있다. CTAB의 과정에서는 액체질소, RNase, phenol과 chloroform 등과 같이 고가이거나 유독한 시약이 대량 쓰여 세심한 주의를 요했다. 추출에 필요한 기기도 50 ml tube 및 1.5 ml tube, tip, 막자사발, water bath, 원심분리기, deep freezer 등이 필요하여 기기 구입에 따른 경제적 어려움이 생길 수 있다. 그리고, 추출에 여러 단계를 거쳐야 하고, 각 단계마다 주의를 요하지 않으면 DNA의 순도가 떨어졌다. 여기에서 확인된 DNA의 농도는 50-200 ng/ $\mu$ l로서 실제 PCR 반응을 위해서는 희석과정이 뒤따라야 했다. 뿐만 아니라 시료의 양이 충분히 확보되지 않으면 DNA 추출 자체를 진행하기 어려운 단점이 있다.

Yu 방법은 총 소요시간은 CTAB 이용 방법에 비해 다소 짧고 시료의 양도 적으나, DNA 추출에 사용되는 기기와 시약에서는 CTAB과 차이가 없었다.

NaOH에 의한 DNA 추출은 다량으로 사용되는 시약이 NaOH와 Tris·HCl 뿐이었고 시료의 종류와 양에 제한이 없었다. 또한 PCR 결과 기존의 방법들과 차이가 없었고 Tris·HCl로 희석한 후 바로 PCR에 이용

할 수 있기 때문에 소요시간이 가장 짧았다. 다른 연구자들도 다량의 시료를 PCR을 통해 검정할 때에는 다량의 시료를 처리하면서 과정이 복잡한 경우 시료가 서로 섞이거나 분실되기도 하므로 DNA 추출과정이 되도록 간단한 것이 좋다는 데 동의하였다.

NaOH에 의한 DNA 추출 기전은 NaOH로 인해 pH가 증가하면 supercoiled DNA가 denaturation 되면서 서로 밀접하게 영키면서 덩어리처럼 변하여 잘 추출되었기 때문이라고 생각된다.

또 한 가지의 성공요인은 STS primer의 개발이다. 본 연구과제에서는 두 친에 대해 dominant marker로서의 STS primer를 개발하여 대상 친과 F1에서만 증폭이 되도록 함으로써 이후 전기영동과정이 없이도 특이 밴드의 증폭 여부를 확인할 수 있도록 하였다. 분자 표지 개발의 연구목적이 다른 경우에는 allele을 구분할 수 있는 co-dominant marker의 개발이 활발하나 본 연구에서처럼 과정의 단순화를 통한 실용적 검정을 목표로 하는 경우에는 dominant marker가 유리할 것이라고 사료된다.

마지막 성공요인은 전기영동의 과정 없이 특이밴드의 증폭을 확인하는 방법의 개발이다.

Gu 등(1995)에 의하면 STS primer에 의한 특이 밴드의 증폭은 spectrophotometer로는 알 수 없으며, 본 연구에서와 같이 EtBr의 PCR tube에의 첨가를 통해 확인할 수 있었다고 하였다. EtBr은 유독한 시약으로 돌연변이를 유기하기 때문에 최대한 사용을 피하기 위하여 pellet painting의 방법도 시도하였는데, 결과는 만족스러웠으나, 아직 고가여서 실용적으로 사용되기에는 어려움이 있을 것으로 예상된다.

실제로 개발된 순도 검정 체계의 효율을 조사하기 위해 중앙종묘(주) 육종연구소에서 시료를 받아 순도 검정을 수행해 본 결과 모계 특이 마커의 primer인 DMM-1과 DMM-8을 사용하였을 때에는 tube내에서 순도검정이 가능하였고, 부계특이마커의 primer인 DMP-1과 DMP-2, DMP-3와 DMP-4를 사용하였을 때에는 전기영동을 하였을 때 100%의 정확도로 검정이 가능하였다.



고추에 있어서 현재 시행하고 있는 순도검정 방법은 당해 생산된 고추 종자의 일부를 10월 초부터 12월말까지 키워 과실을 관찰함으로써 이루어지고 있으며, 이와 같은 포장에서의 순도검정은 표지로 사용될 표현형이 나타나기까지의 기간이 약 3개월 걸리고 고추 특성상 해외에서 이루어지기 때문에 출장비 및 현지에서의 포장경비를 포함하여 주당 약 607원이 소비되며 100%의 정확도를 보이는 반면 분자표지인 RAPD를 순도검정에 이용할 경우 각구 및 시약이 많이 소요되며, 시료의 DNA 추출을 위한 과정이 복잡하고 전기영동을 통해서만 확인이 가능하기 때문에 시료의 DNA 추출로부터 검정이 완료될 때까지 24시간 이상이 소요되어 포장검정보다는 시간이 단축되는 장점이 있지만 비용이 증가하고 정확도도 95% 이내로 감소된다. 그러나 NaOH 방법을 이용하여 DNA를 추출하고 STS primer를 사용하는 본 체계는 시료에 구애받지 않고 종묘의 순도를 검정할 수 있고 재현성과 정확도를 향상시킬 수 있었으며, 단가도 감소하여 경제적인 검정이 가능하였다(표 4).

결론적으로 본 연구를 통해 PCR 방법을 이용한 실용적인 고추 종자의 순도검정 방법이 개발되었다고 확신하며, 앞으로도 이와 같은 방법을 응용하여 다른 작물과 다른 품종에 대해서도 실용적인 순도 검정 체계를 확보하는 것이 우리나라의 종묘산업의 발전과 농업 전반에 힘을 줄 수 있다고 사료된다.

표 4. 종묘 순도 검정에 있어서 관행 포장 검정 방법, RAPD 이용 방법, 본 연구과제에서 개발된 방법간의 실용성 비교

	포장 검정	RAPD	개발 방법
소요시간	3 개월	24시간	4시간
비용	607원	900원	600원
정확도	100%	95%	100%

## 제 7 장 종합고찰

본 연구의 목표는 국내에서 중요한 위치를 차지하는 몇 가지 채소 작물에 대해 제초제 저항성 유전자를 형질전환하여 진정한 일대교잡 종묘만을 선별해 낼 수 있도록 함으로써 종묘의 순도를 적극적으로 높이는 데 있다.

본 연구의 결과로 고추와 브로콜리, 케일, 배추, 오이, 수박 등의 작물에 있어 효율적인 재분화 체계와 형질전환 체계를 확립하였는데, 이 작물들은 아직까지 재분화 과정도 보고가 드문 작물로서 본 연구의 결과는 매우 가치 있는 것이라 할 수 있다. 앞으로 이 체계들을 이용하여 유용 유전자를 도입한 형질전환 작물들을 얻을 수 있을 것이라 사료되며, 이것은 앞으로 다가오는 종자전쟁 시대에 소중한 자원이 될 것이다.

특히, 본 연구에서는  $F_1$  hybrid를 재료로 이용한 다른 연구에서와는 달리 inbred line을 재료로 이용함으로써  $F_1$  hybrid를 재료로 이용하였을 때 문제가 되는 후대에서의 분리를 해결할 수 있어 형질전환 산물의 종묘산업에서의 실용화를 앞당길 수 있었으며, 원예작물에 있어  $F_1$  hybrid를 이용하지 않아도 형질전환을 효율적으로 수행할 수 있다는 것을 보여 지금까지의 재료 선택 경향을 바꿔 산·학·연 간의 연계를 공고히 하는 데 도움이 될 것으로 예상된다.

고추의 경우 그동안 고비로 회자되어왔던 기형 shoot와 shoot 신장 문제를 해결하였으며, PCR과 southern blot analysis, bioassay 등을 수행하여 형질전환체를 선별할 수 있었다. 고추는 선발에 이용한 제초제의 농도가 다른 작물의 1/6 수준이었으나, 이 농도에서 비형질전환체는 완전히 고사하였고, 평아주 등 몇 개 잡초에 살포한 결과 그 작물들도 고사하였으므로, 이 농도를 선발 농도로 이용하는 데에는 무리가 없다고 사료된다. 실제로 *bar* 유전자가 저항성을 나타내는 메커니즘을 보면 식물에 *bar* 유전자가 있다 하더라도 제초제를 많은 양 살포할 경우 해를 입게 되므로, 형질전환체라 하더라도 각 작물별로 다른 저항성을 보일 수 있을 것이라 생각된다.

그러나, 고추에 있어서는 형질전환체를 검정하는 방법을 아직까지 확실하게 확립하지 못했는데, 그 예로 southern blot analysis의 결과가 다른 작물에 비해 명확하지 않으며, 이것은 앞으로 고추의 형질전환에 있어서 해결해야 할 문제 중의 하나이다.

십자화과 작물의 경우 재분화 및 형질전환이 어려웠던 배추와 브로콜리, 케일에 대해 형질전환체를 얻었으며, 이들의 발현을 분자적 수준의 검정과 생물검정에서 확실히 확인하였고, 특히 브로콜리의 경우에는 T<sub>3</sub> 세대까지 진전시켜 실제로 비형질전환체인 모계와 교배하여 그 일대교잡 개체가 형질전환체인 부계와 마찬가지로 제초제에 저항성을 보이는 것을 확인함으로써, 제초제 저항성 유전자를 이용하여 채소 작물의 일대교잡종의 순도를 높일 수 있음을 증명하였다. 본 연구에서 획득한 브로콜리 형질전환체는 일반 샐포 농도의 2배의 농도에도 해를 입지 않을 정도로 완벽한 저항성을 보였으며, 후대 유전도 안정적인 것으로 확인되어 앞으로 바로 실용화가 가능할 것으로 예상되며, 본 연구의 가장 자랑스러운 성과라 하겠다.

박과 작물의 경우 체세포배발생을 통한 오이의 형질전환 체계를 세움으로써 형질전환의 시료를 무한한 규모로 얻을 수 있다는 큰 장점이 있는 형질전환 체계를 확보할 수 있었다. 그러나, 확보한 형질전환체가 임성이 없었다는 것은 전혀 예기치 못한 일이었으며, 앞으로 형질전환 연구에 있어서 이런 경우에 대비할 수 있도록 형질전환체를 화분친으로 사용하는 것뿐만 아니라 모친으로도 사용하거나 삼목이나 접목을 통해 clon을 확보하는 등의 여러 방안을 고려해야 할 것이라 사료된다.

수박의 경우에도 재분화 과정에서 발근이 어려웠던 것은 전혀 예상치 못했던 일로서, 연구의 속도를 더디게 하였으며, 이것도 역시 앞으로 수박의 형질전환 시 shoot에서의 발근 유도보다는 빠른 접목을 통해 해결해야 할 것임을 시사하였다.

전체적으로 볼 때 소정의 목표를 모두 달성한 것은 아니나 브로콜리의

경우에는 목표했던 바를 모두 달성하여, 이 연구가 곧바로 실용될 수 있는 것임을 증명하였고, 다른 작물에 대한 연구들도 앞으로 1 세대 정도만 진전되면 실용성을 가늠할 수 있는 수준에 와 있다.

고추의 RAPD를 이용한 종묘 순도 검정법 개발은 40 샘플을 검정하는데, 4시간이면 충분한 체계로 개발되었으며, PCR과 DNA 추출에 필요한 기본적인 시약과 설비만 있으면 언제라도 실제로 사용할 수 있는 기술이다.

따라서, 본 연구에서 확립된 재분화 체계와 형질전환 체계는 앞으로 각 작물에 유용 유전자를 도입하는 데 쓰이는 한 편, 특히 출원 등의 계획도 갖고 있으며, 본 연구에서 얻어진 형질전환 계통들은 몇 가지 검정을 거쳐 품종 등록 여부를 결정할 것이다. 그리고, RAPD를 이용한 종묘 순도 검정법은 원하는 기업과 실시계약을 체결할 수 있을 것으로 예상되며, 이를 위해 노력할 것이다.

## 제 8 장 인용문헌

### 1. 제초제 저항성 유전자를 이용한 가지과 작물의 종묘 순도 향상법 개발

Agrawal, S., N. Chandra, and S.L. Kothari. 1989. Plant regeneration in tissue cultures of pepper (*Capsicum annuum*). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 16:47-55.

Arroyo, R. and M.A. Revilla. 1991. In vitro plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars. Plant Cell Reports 10:414-416.

백그림. 1999. 고추의 체세포배 형성에 관한 연구. 서울대학교 석사학위논문

Biddington, N.L. 1992. The influence of ethylene in plant tissue culture. Plant Growth Regulation. 11:173-187.

Binzel, M.L., N. Sankhla, S. Joshi, and D. Sankhla. 1996. In vitro regeneration in chile (*Capsicum annuum* L.) from 'half-seed explants' Plant Growth Regulation. 20:287-293.

Binzel, M.L., N. Sankhla, S. Joshi, and D. Sankhla. 1996. Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Reports 15:536-540.

Bollmark, M. and L. Elliasson. 1990. Ethylene accelerates the breakdown of cytokinins and thereby stimulates rooting in Norway spruce hypocotyl cuttings. Physiol. Plant. 80:534-540.

Bondt, A.D., K. Eggermont, P. Druart, M.D. Vil, I. Goderis, J. Vanderleyden, and W.F. Broekaert. 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus × domestica* Borkh.): An assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. Plant Cell Reports 13:587-593.

Buyukalaca, S. and F. Mavituna. 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 46:227-235.

- Chengalrayan, K., V.B. Mhaske, and S. Hazra. 1998. Genotypic control of peanut somatic embryogenesis. *plant Cell Reports* 17:522-525.
- Choi, E.Y., J.Y. Jo, D. Choi, and K.W. Lee. 1996. Plant regeneration *via* organogenesis from seed explants in red pepper (*Capsicum annuum* L.). *J. Plant Biol.* 39(3):167-172.
- 최경영. 1991. 고추의 adventitious shoots와 체세포배 형성에 관한 연구. 서울대학교 석사학위논문.
- Christopher, T. and M.V. Rajam. 1996. Effect of genotype, explant and medium on *in vitro* regeneration of red pepper. *plant Cell Tiss. Org. Cult.* 46:245-250.
- Confalonieri, M., A. Balestrazzi, S. Bisoffi, and R. Cella. 1995. Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in several black poplar clones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43:215-222.
- Dewald, S.G., R.E. Litz, and G.A. Moore. 1989. Maturation and germination of mango somatic embryos. *Journal of American Society of horticultural Science* 114(5):837-841.
- Diaz, I., R. Moreno, and J.B. Power. 1988. Plant regeneration from protoplasts of *Capsicum annuum*. *Plant Cell Reports.* 7:210-212.
- Dong, C.Z., C.X. Jiang, and L.X. Feng. 1995. Transgenic tomato and pepper plants containing CMV sat-RNA cDNA. *Acta horticulturae.* 402:78-86.
- Ebida, A.I.A. and C.Y. Hu. 1993. *In vitro* morphogenetic responses and plant regeneration from pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Early California Wonder) seedling explants. *Plant Cell Reports* 13:107-110.
- Ezura, H., S. Nishimiya, and M. Kasumi. 1993. Efficient regeneration of plants independent of exogenous growth regulators in bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports* 12:676-680.
- Fari, M. and M. Czako. 1981. Relationship between position and morpho- genic response of pepper hypocotyl explants cultured *in vitro*. *Sci. Hortic.* 15:207-213.

- Fari, M. and Z. Iory. 1990. Comparative studies on *in vitro* regeneration of seedling explants in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Acta Horticulturae* 280:131-134.
- Fuller, K.J. and E.W. Nester. 1996. Temperature affects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* 178(6):1498-1504.
- Gunay, A.L. and P. S. Rao. 1978. *In vitro* plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of red pepper. *Plant Sci. Lett.* 11:365-372.
- Harini, I. and G. Lakshmi Sita. 1993. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science* 89:107-112.
- Hoshino, Y., I. Turkan, and M. Mii. 1998. Transgenic bialaphos-resistant snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) produced by *Agrobacterium rhizogenes* transformation. *Scientia Horticulturae* 76:37-57.
- Hyde, C.L. and G.C. Phillips. 1996. Silver nitrate promotes shoot development and plant regeneration of chile pepper (*Capsicum annuum* L.) via organogenesis. *In Vitro Cell Dev. Biol., Plant.* Columbia, MD: Society for In Vitro Biology. 32(2):72-80.
- Jacq, B., O. Lesobre, R.S. Sangwan, and B.S. Sangwan-Norreel. 1993. Factors influencing T-DNA transfer in *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarbeet. *Plant cell Reports* 12:621-624.
- Janssen, B.J. and R.C. Gardner. 1993. The use of transient GUS expression to develop an *Agrobacterium*-mediated gene transfer system for kiwifruit. *Plant Cell Reports* 13:28-31.
- Jayashanker, S., S. Bagga, and G.C. Phillips. 1997. Sweet pepper (*Capsicum annuum*) transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. *HortScience* 32:454.
- Jefferson, R.A., T.A. Kavanagh, and M.W. Bevan. 1987. GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion maker in higher

plants. *EMBO J.* 6:3901-3907.

Jeong, W.J., S.R. Min, J.R. Liu, Y.J. Park, and K.W. Cho. 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration in immature zygotic embryo cultures of hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Korean J. Plant Tissue Culture* 21(5):299-302.

Jeong, W.J., S.R. Min, M.Y. Ahn, J.R. Liu, Y.J. Park, and K.W. Cho. 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cell suspension cultures of pepper. *Korean J. Plant Tissue Culture* 23(4):223-226.

Jo, J.Y., E.Y. Choi, D. Choi, and K.W. Lee. 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryo culture in pepper (*Capsicum annuum* L.). *J. Plant Biol.* 39(2):127-135.

Kawahara, R. and A. Komanine. 1991. Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot. *Kor. J. Plant Tissue Culture* 18:339-344

Kim, S.J., S.J. Lee, B.D. Kim, and K.H. Paek. 1997. Satellite-RNA-mediated resistance to cucumber mosaic virus in transgenic plants of hot pepper (*Capsicum annuum* cv. Golden Tower). *Plant Cell Reports* 16: 825-830.

이도현. 1993. 고추의 기내 재분화와 형질전환에 관한 연구. 서울대학교 석사학위논문.

Lee, S.J., B.D. Kim, and K.H. Paek. 1993. *In vitro* plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from cotyledon explant of hot pepper (*Capsicum annuum* cv. Golden Tower). *Korean J. plant Tissue Culture*. 20:289-294.

Liu, W., W.A. Parrott, D.F. Hildebrand, G.B. Collins, and E.G. Williams. 1990. *Agrobacterium* induced gall formation in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and formation of shoot-like structures expressing introduced genes. *Plant Cell Reports* 9(7):360-364

Manoharan, M., C.S. Sree Vidya, and G. Lakshmi Sita. 1998. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in hot chili (*Capsicum annuum* L. var. Pusa jwala). *Plant Science* 131:77-83.



- Moreno, D.R. and J.B. Power. 1988. Plant regeneration from protoplasts of *Capsicum annuum*. Plant cell reports 7:210-212.
- Mozo, T. and P.J.J. Hooykaas. 1992. Factors affecting the rate of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Nicotiana glauca* plant cells. Plant Molecular Biology 19:1019-1030.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum 15: 473-497.
- Nordstrom, A.C. and L. Eliasson. 1993. Interaction of ethylene with indole-3-acetic acid in regulation of rooting in pea cuttings. Plant Growth Regulation. 12:83-90.
- Norgaard, J.V. and P. Krogstrup. 1991. Cytokinin induced somatic embryogenesis from immature embryos of *Abies nordmanniana* LK. Plant Cell Reports 9:509-513.
- Palmer, C.E. 1992. Enhanced shoot regeneration from *Brassica campestris* by silver nitrate. Plant Cell Reports. 11:541-545.
- 박혜연. 1999. 고추에 있어서 제초제 저항성 유전자의 형질전환에 관한 연구. 서울대학교 석사학위 논문
- Parrott, W.A. 1991. Auxin-stimulated somatic embryogenesis from immature cotyledons of white clover. Plant Cell Reports 10:17-21.
- Pena, L., M. Cervera, J. Juarez, A. Navarro, J.A. Pina, N.D. Vila, and L. Navarro. 1995. *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Reports 14:616-619.
- Phillips, G.C. and J.F. Hubstenberger. 1985. Organogenesis in pepper tissue cultures. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 4:261-269.
- Pigeaire, A., D. Abernethy, P. M. Smith, K. Simpson, N. Fletcher, C. Y. Lu, C. A. Atkins, and E. Cornish. 1997. Transformation of a grain legume (*Lupinus Angustifolius* L.) via *Agrobacterium tumefaciens* -mediated gene transfer to shoot apices. Molecular Breeding 3(5):341-349.
- Prapa Spirichit, E. Nawata, and S. Shigenaga. 1987. *In vitro*

- shoot-forming capacity of cotyledon explants in red pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Yayusufusa). Japan. J. Breed. 37:133-142.
- Pua, E.C., G.E. Sim, G.L. Chi, and L.F. Kong. 1996. Synergistic effect of ethylene inhibitors and putrescine on shoot regeneration from hypocotyl explants of Chinese radish (*Raphanus sativus* L. var. *longipinnatus*) *in vitro*. Plant Cell Reports. 15:685-690.
- Ramage, C.M. and D.W.H. Leung. 1995. Influence of BA and sucrose on the competence and determination of pepper (*Capsicum annuum* L. var. Sweet Banana) hypocotyl cultures during shoot formation. Plant Cell Reports 15:974-979.
- Rotino, G.L., D. Perrone, P. Ajmone-Marsan, and E. Lupotto. 1992. Transformation of *Solanum integrifolium* Poir via *Agrobacterium tumefaciens*: Plant regeneration and progeny analysis. Plant Cell Reports 11:11-15.
- Saxena, P.K., R. Gill, A. Rashid, and S.C. Maheshwari. 1981. Isolation and culture of protoplasts of *Capsicum annuum* L. and their regeneration into plants flowering *in vitro*. Protoplasma 108:357-360.
- Scholten, H.J. and R.L.M. Pierik. 1998. Agar as a gelling agent: chemical and physical analysis. Plant Cell Reports 17:230-235.
- Skoog, F. and C.O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. No. 11 The biological action of growth substances pp.118-131.
- Szasz A., G. Nervo, and M. Fari. 1995. Screening for *in vitro* shoot-forming capacity of seedling explants in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes and efficient plant regeneration using thidiazuron. Plant Cell Reports 14:666-669.
- Uematsu, C., M. Murase, H. Ichikawa, and J. Imamura. 1991. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of kiwi fruit. Plant Cell Reports 10:286-290.
- Valera-Montero, L.L. and N. Ochoa-Alejo. 1992. A novel approach for chili pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration : Shoot induction

in rooted hypocotyls. *Plant. Sci.* 84:215-219.

Yang, D.C., K.Y. Lee, Y.S. Yoo, K.H. Choi, and H.T. Lim. 1997. Plant regeneration and expression of mouse adenosine deaminase gene in transgenic hot pepper (*Capsicum annuum* L.) Plants. *Korean J. Plant Tissue Culture* 24:37-41.

양삼섭. 2000. 제초제 저항성 유전자의 형질전환을 이용한 고추 F<sub>1</sub> 종자의 순도검정법 개발. 서울대학교 석사학위논문

Yu, S.N., K.M. Bae, and P.O. Lim. 1996. Transformation of TMV-OM strain coat protein gene in *Capsicum annuum* L. for viral disease resist- ance. *Korean J. Breed.* 28(1):85-91.

Zhu, Y.X., W.J.O. Yang, Y.F. Zhang, and Z.L. Chen. 1996. Transgenic sweet pepper plants from *Agrobacterium* mediated transformation. *Plant Cell Reports* 16:71-75.

## 2. 제초제 저항성 유전자를 이용한 십자화과 작물의 종묘 순도 향상법 개발

Boulter, M. E., E. Croy, P. Simpson, R. D. D. Croy, and A. H. Shirsat. 1990. Transformation of *Brassica napus* L. (oilseed rape) using *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*-a comparison. *Plant Science* 70, 91-99.

Charest, P. J., L. A. Holbrook, J. Gabard, V. N. Iyer, and B. L. Miki. 1988. *Agrobacterium* mediated transformation of thin cell layer explants from *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.* 75, 483-445.

Chi, G. L., D. G. Barfield, G.-E. Sim, and E.-C. Pua, 1990. Effect of AgNO<sub>3</sub> and aminoethoxyvinylglycine on *in vitro* shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *Brassica* genotypes. *Plant Cell Reports* 9, 195-198.

Christey, M. C. and B. K. Sinclair, 1992. Reeneration of transgenic kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*), rape (*B.napus*) and turnip (*B. campestris* var. *rapifera*) plants via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. *Plant Science* 87, 161-169.

De Block, D. Brouwer, and P. Tenning, 1989. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the *bar* and *neo* genes in the transgenic plants. *Plant Physiol.* 91, 694-701

Debergh, P., Y. Harbaoui, and R. Lemeur, 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): Evaluation of different hypothesis to overcome vitrification with special reference to water potential *Physiol. Plantarum.* 53, 181-187.

Eimert, K. and F. Siegemund. 1992. Transformation of Cauliflower *Brassica oleracea* L. var *Botrytis*-an experimental survey. *Plant Mol. Biol.* 19, 485-490.

Establishment of regeneration system of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* via organogenesis

Zhang, F. L., Y. Takahata, and J. B. Xu. 1998. Medium and genotype factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *prkinensis*).

Fry, J., A. Barnason, and R. B. Horsch, 1987. Transformation of *Brassica napus* with *Agrobacterium* based vectors. *Plant Cell Reports* 6, 321-325.

Poulsen, G. B. 1996. Genic transformation of *Brassica*. *Plant Breeding* 115, 209-225.

Glimelius, K., 1984. High growth rate and regeneration capacity of hypocotyl protoplasts in some *Brassicaceae*. *Physiol. Plantarum* 61, 38-44.

Lim, H. T., E. J. Park, Y. S. You, B. Y. Kim, and Y. N. Song. High plant regeneration, genetic stability of regenerants, and genetic transformation of herbicide resistance gene (*bar*) in chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*).

Hachey, J. E., K. K. Sharma, and M. M. Moloney, 1991. Efficient shoot regeneration of *Brassica campestris* using cotyledon explants cultured *in*

*in vitro*. Plant Cell Reports 9, 549-554

Godwin, I., T. Grodon, F. L. Brian, and H. John Newbury. 1991. The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plant species. Plant Cell Reports. 9:671-675

De Vries J. and W. Wackernagel. 1998. Detection of *npt II* (kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation. Mol Gen Genet, 257 : 606-613.

Jain, R. K., J. B. Chowdhury, D. R. Sharma, and W. Friedt, 1988. Genotypic and media effects on plant regeneration from cotyledon explant cultures of some *Brassica* species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 14, 197-206.

Janssens, J., A. D. Sonville, T. Moens, and C. Opsomer, 1995. Genetic modification of *Brassica napus* by *Agrobacterium* mediated transformation. In: Workshop on *Brassica napus* L-4. EUCARPIA Helsingør, March 1995.

John R. Z. and P. Zambruski. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the Plant Cell. Plant Physiol. 107 : 1041-1047.

Araya, K. R., R. C. Gupta, B. D. Semwal, and M. U. Beg. 1994. In vitro selection of endosulfan-tolerant strains of *Brassica campestris* (cv. Brown Sarson). Plant Cell Reports 14 : 137-140.

Khehra, G. S. and R. J. Mathias, 1992. The interaction of genotype, explant and media on the regeneration of shoots from complex explants of *Brassica napus* L. J. Experimental Botany 43, 1413-1418.

Kim, B. K. 1998 . Introduction of resistant herbicide gene, bar, into Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) using *Agrobacterium tumefaciens*. 강원대학교 석사 논문

Lim, H. T, Y. S. Yoo, E. J. Pahk, and Y. N. Song. Establishment of regeneration system of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* using leaf and petiole explants.

- Christey, M. C., B. K. Sinclair, and R. H. Braun. 1997 . Regeneration of transgenic vegetable brassica (*Brassica oleracea* and *B. campestris*) via Ri-mediated transformation. *Plant Cell Reports*, 16 : 587-593.
- Dietert, M. F., S. A. Barron, and O. C. Yoder. 1982 . Effects of genotype on *in vitro* culture in the genus *Brassica*. *Plant Science Letters*, 26, 233-240
- Melchers, L. S., A. J. G. Regensburg-Tuink, R. A. Schilperoort, and P. J. J. Hooykaas. 1989. Specificity of signal molecules in the activation of *Agrobacterium* virulence gene expression. *Mol. Microbiol.* 3, 969-977.
- Moloney, M. M., J. M. Walker, and K. K. Sharma. 1989. High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. *Plant Cell Reports* 8. 238-242.
- Mukhopadhyay, A., N. Arumugam, P. B. A. Nandakumar, A. K. Pradhan, V. Gupta, and D. Pental. 1992. *Agrobacterium* mediated genetic transformation of oilseed *Brassica campestris*. Transformation frequency is strongly influenced by the mode of shoot regeneration *Plant Cell Reports* 11, 506-513.
- Murata, M. and T. J. Orton. 1987. Callus initiation and regeneration capacities in *Brassica* species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 11, 111-123.
- Narasimhulu, S. B. and V. L. Chopra. 1988. Species specific shoot regeneration response of cotyledonary explants of *Brassicacae*. *Plant Cell Reports* 7, 104-106.
- Narasimhulu, S. P. and V. L. Chopra. 1988. Comparative shoot regeneration responses of diploid *Brassicacae* and their synthetic amphidiploid products. *Plant Cell Reports* 7, 525-527
- Ovesna, J., L. Ptacek, and Z. Opatrny, 1993. Factors influencing the regeneration capacity of oilseed rape and cauliflower in transformation experiments. *Biologia Plantarum* 35, 107-112.
- Palmer, C. E., 1992. Enhanced shoot regeneration from *Brassica*

- campestris* by silver nitrate. Plant Cell Reports 11, 541-545.
- Pechan, P. M., 1989. Successful cocultivation of *Brassica napus* microspores and proembryos with *Agrobacterium*. Plant Cell Reports 8, 387-390.
- Poulsen, G. B. and S. V. S. Nielsen, 1989. Regeneration of plants from hypocotyl protoplasts of rapeseed (*Brassica napus* L. var. *oleifera*) cultivars. Plant Cell Reports 17, 153-158.
- Radke, J., C. Turner, and D. Facciotti, 1992. Transformation and regeneration of *Brassica rapa* using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports 11, 499-505.
- Deng, S. Y., I. M. Heap, and T. A. Klein. 1991 . In vitro vegetative propagation of chinese cabbage. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 26 . 135-139
- Sethi, U., A. Basu, and S. G. Mukherjee, 1990. Role of inhibitors in the induction of differentiation in callus cultures of *Brassica*, *Datura* and *Nicotiana*. Plant Cell Reports 8, 598-600.
- Stachel, S. E., E. Messens, M. van Montagu, and P. Zambryski, 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate E-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. Nature 318, 624-629.
- Suh, S. K., H. G. Park, and S. K. Green. 1996 . Interactions among TuMV strains inoculated and their movement in chinese cabbage. J. Kor. Soc, Hort. Sci. 37(3) : 392-398.
- Takasaki T., K. Hatakeyama, K. Ojima, M. Watanabe, and K. Toriyama Kata. 1997. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated formation of *Brassica rapa* L. Breed Sei 47:127-134.
- Yang, M. Z., S. R. Jia. and E. C. Pua. 1991. High frequency of plant regeneration from hypocotyl explants of *Brassica carinata* A. Br. Plant Cell Tissue and Organ Culture 24, 79-82.
- Yoo, Y. S. 1996 . Establishment of Plant Regeneration and Genetic

Transformation Systems for *Brassica* Species. 강원대학교 석사 논문  
Lee, Y. B., E. K. Lee, I. K. Ham, B. J. Seong, and K. S. Choi. 1992. Putative transformation of *Brassica oleracea* by *Agrobacterium tumefaciens*. Korean J. Plant Tissue Culture, Vol. 19, No. 1, 19-22.

### 3. 재초제 저항성 유전자를 이용한 호로과 작물의 종묘 순도 향상법 개발

Akama, K., H. Puchta, and B. Hohn. 1995. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the *bar* gene as selectable marker. *Plant Cell Rep* 14:450-454

Casas, A. M. 1993. Transgenic sorghum plants via microprojectile bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11212-11216

Chee, P. P. and D. M. Tricoli. 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension cultures of *Cucumis sativus* L. *Plant Cell Rep* 7:274-277

Chee, P. P. 1990a. High frequency of somatic embryogenesis and recovery of fertile cucumber plants. *HortScience* 25:792-793

Chee, P. P. 1990b. Transformation of *Cucumis sativus* tissue by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transformed plant. *Plant Cell Rep* 7:245-248

Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159

Chrispeels M. J. and D. E. Sadava. 1994. Plants, Genes, and Agriculture. Jones and Bartett Publishers, London

Datta, S. K., K. Datta, and I. Potrykus. 1992. Herbicide-resistance indica rice plants from IRRI breeding line IR72 after PEG-mediated transformation of protoplast. *Plant Mol Biol* 20:619-629

Deakin, J. R., G. W. Bohn, and T. W. Whitaker. 1971. Interspecific hybridization in *Cucumis*. *Econ. Bot* 25:196-211



- Debeaujon, I. and M. Branchard. 1993. Somatic embryogenesis in *Cucubitaceae*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 34:91-100
- De Block, M. D., J. Bitterman, C. Thompson, M. Van Montagu, and J. Leemans. 1987. Engineering herbicide resistance in plant by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO* 6:2513-2518
- De Greef, W., R. Delon, M. Block, J. Leemans, and J. Botterman. 1989. Evaluation of herbicide resistance in transgenic crops under field condition. *Bio/Technology* 7:61-64
- Dellaporta, S. L., J. Wood, and J. B. Hicks. 1983. A Plant DNA miniprep: Version 2 *Plant Mol Biol Rep.* 1:19
- D'Halluin, K. and J. Botterman. 1992. The *bar* gene as selectable and screenable marker in plant engineering. *Method in Enzymology* 216:415-426
- Dekeyser, R., B. Claes, M. Marichal, M. Van Montagu, and A. Caplan. 1989. Evaluation of selectable markers rice transformation. *Plant physiol* 90:217-223
- Eliseu, S., L. F. A. Figueiredo, and D. C. Monte-Neschich. 1994. Transformation of potato (*Solanum tuberosum* cv. mantiqueira) using *Agrobacterium tumefaciens* and evaluation of herbicide resistance. *Plant Cell Rep* 13:666-670
- Fillatti, J. J., J. Kiser, R. Rose, and L. Comai. 1987. Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Bio/Technology* 5:726-730
- Fromm, M.E., F. Morrish, C. Armstrong, R. William, J. Thomas, and T. M. Klein. 1990. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plant. *Bio/Technology* 8:833-839
- Gambley, R. L. and W. A. Dodd. 1990. An in vitro technique for the production de novo of multiple shoots in cotyledon explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 20:177-183

- Hall, R. D. and F. A. Krens. 1996. A high efficiency technique for the generation of transgenic sugar beets from stomatal guard cells. *Nature Biotechnology* 14:1133-1138
- Hauptmann, R. M., V. Vasil, P. Ozias-Akins, and I. K. Vasil. 1988. Evaluation of selectable markers for obtaining stable transformants in the Graminae. *Plant Physiol* 86:602-606
- Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari, and T. Kumashiro. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant Journal* 6:271-282
- Hinchee, M. A. W., D. V. Conner Ward, C. A. Newell, R. E. McDonnell, S. J. Saito, C. S. Grasser, D. A. Fischhoff, D. B. Re, R. T. Fraley, and R. B. Horsch. 1988. *Bio/technology* 6:915-922
- Jeffrey, C. 1980. A review of the *Cucurbitaceae*. *Bot. J. Linn. Soc.* 81 :233-247
- Kim, J. W., S. Y. Oh, H. S. Lee, and S. S. Kwak. 1998. Plant regeneration through organogenesis and somatic embryogenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Korean J Plant Tissue Culture* 25 :201-206
- Kim, S. G., J. R. Chang, H. C. Cha, and K. M. Lee. 1988. Callus growth and plant regeneration in diverse cultivars of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ culture* 12:67-74
- Kung, S. D. and R. Wu. 1993. *Transgenic Plants*. Volume 1, 2. Academic Press, Inc. San Diego
- Lee, H. Y., I. S. Nou, J. H. Kim, J. R. Liu, H. J. Kim, and T. Kameya. 1994. Development of bialaphos resistance transgenic tobacco plant by pollination and utilization of fertilization cycle. *Korean J Plant Tiss Cult* 21:99-103
- Lim, Y. P., H. R. Kim, J. Y. Park, and Y. H. Cho. 1995. Transformation and genetic analysis of herbicide resistance tobacco and tomato by

transformation of modified *bar* gene using directed mutagenesis method. *RDA J Agri Sci* 37:45-53

Lou, H. and S. Kako. 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cucumber. *HortScience* 29:906-909

Machado, A. C., M. Puschmann, and M. L. C. Machado. 1995. Somatic embryogenesis of *Prunus subhirtella autumnno rosa* and regeneration of transgenic plant after *Agrobacterium*- mediated transformation. *Plant Cell Rep* 14:335-340

Malepszy, S. and A. Nadolska-Orczyk. 1983. In vitro culture of *Cucumis sativus*: L. Regeneration of plantlets from callus formed by leaf explants. *Z Pflanzenphysiol* 111:273-276

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497

Newhouse, K., B. Singh, D. Shaner, and M. Stidham. 1991 Mutation in corn (*Zea mays* L.) conferring resistance to imidazolinone herbicides. *Theor Appl Genet* 83:65-70

Perl, A., O. Lotan, and D. Holland. 1996. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): The role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions. *Nature Biotechnology* 14:624-628

Punja, Z. K., F. A. Tang, and G. G. Sarmiento. 1990. Isolation, culture and plantlet regeneration from cotyledon and mesophyll protoplast of two pickling cucumber (*Cucumis sativus* L) genotypes. *Plant Cell Rep* 9:61-64

Raharjo, S. H. T. and Z.K. Punja. 1994. Regeneration of plantlets from embryogenic suspension cultures of pickling cucumber (*Cucumis sativus* L. cv Endeavor). *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 30: 16-20

Raharjo, S. H. T., M. O. Hernandez, Y. Y. Zhang, and Z. K. Punja. 1996. Transformation of pickling cucumber with chitinase- encoding gene using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 15:591-596

- Rathore, K. S., V. K. Chowdhury, and T. K. Hodges. 1993. Use of *bar* as a selectable marker gene and for the production of herbicide-resistance rice plants from protoplast. *Plant Mol Biol* 21: 871-884
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning - A Laboratory manual*, 2nd ed Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY
- Shan, D. M., R. B. Horsch, H. J. Klee, G. M. Kishore, J. A. Winter, N. E. Tumer, C. M. Hironaka, P. R. Sanders, S. C. Gasser, S. Aylkent, N. R. Seigel, S. G. Rogere, R. T. Fraley. 1986. *Science* 233: 479-481
- Spencer, T. M., W. J. Gordon-Kamma, R. J. Daines, W. G. Start, and P. G. Lemaux. 1990. Bialaphos selection of stable transformation from maize cell culture. *Theor Appl Genet* 79: 625-634
- Taylor, N. J., M. Edward, and G. G. Henshaw. 1996. Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in casava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nature Biotechnology* 14:726-730
- Thompson, C. J., N. R. Movva, R. Tizard, R. Crameri, J. E. Davies, M. Lauwery, and J. Botterman. 1987. Characterization of the herbicide resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus* *EMBO* 6:2519-2523
- Trick, H. N. and J. J. Finer. 1998. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max* L. Merrill) embryogenic suspension culture tissue. *Plant Cell Rep* 17:482-488
- Vasil, V., V. Srivastava, A. M. Castillo, M. E. Fromm, and I. K. Vasil. 1993. Rapid production of transgenic wheat plant by direct bombardment of cultured immature embryos. *Bio/Technology* 11: 1553-1558
- Wan, Y. and P. G. Lemaux. 1994. Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiol* 104:37-48
- Weeks, J. T., O. D. Anderson, and A. E. Blechl. 1993. Rapid production

of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiol* 102:1077-1084

Ziv, M., G. Gadasi. 1986. Enhanced embryogenesis and plant regeneration from cucumber (*Cucumis sativus* L.) callus by activated charcoal in solid/liquid double-layer cultures. *Plant Sci* 47:115-122

#### 4. RAPD를 이용한 실용적인 종묘 순도 검정법 개발

Chunwongse, J., G. B. Martin, and S. D. Tanksley. 1993. Pre-germination genotypic screening using PCR amplification of half-seeds. *Theor. Appl. Genet.* 86:694-698.

Dax, E., O. Livneh, O. Edelbaum, N. Kedar, N. Gavish, H. Karchi, J. Milo, I. Sela, and H. D. Rabinowitd. 1994. A random amplified polymorphic DNA (RAPD) molecular markers for the Tm-2<sup>a</sup> gene in tomato, *Euphytica* 74:159-163

Delourme, R., A. Bouchereau, N. Hubert, M. Renard, and B. S. Landry. 1994. Identification of RAPD markers linked to a fertility restorer gene for the Ogura radish cytoplasmic male sterility of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet*88:741-748.

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15

Edwards, K., C. Johnstone and C. Thompson. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucl. Acids Res.* 19(6):1349

Gu, W. K., N. F. Weeden, J. Yu, and D. H. Wallace. 1995. Large-scale, cost-effective screening of PCR products in marker-assisted selection applications. *Theor. Appl. Genet.* 91:465-470

Kim, H-J. and H-G. Park. 1984. Application of electrophoresis in testing the genetic purity of F1 hybrid seeds of *Raphanus sativus*. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 25(4):256-262

김용재. 1996. RAPD를 이용한 고추의 유전적 다양성 분석과 품종구분에

관한 연구. 서울대학교 대학원 석사논문.

Klein-Lankhorst, R.M., A. Vermunt, R. Weide, T. Liharska, and P. Zabel. 1991. Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) *Theor. Appl. Genet.* 83:108-114.

권오열. 1987. 전기영동법에 의한 호박의 계통분류와 F<sub>1</sub>순도검정에 관한 연구. 건국대학교 대학원 석사학위논문.

Levi, A., L.J. Rowland, and J.S. Hartung. 1993. Production of reliable randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers from DNA of woody plants. *HortScience* 28(12):1188-1190

Liu, Y.S., R.J.S. Thomas, and W.A. Phillips. 1995. Single-step direct PCR amplification from solid tissues. *Nucleic Acids Research.* 23(9):1640

Livneh, O., Y. Nagler, Y. Tal, S.B. Harush, Y. Gafu, J.S. Beckmann, and I. Sela. 1990. RFLP analysis of a hybrid cultivar of pepper (*Capsicum annum*) and its use in distinguishing between parental lines and in hybrid identification. *Seed Sci. Technol.* 18:209-214.

Livneh, O., E. Vardi, Y. Stram, O. Edelbaum, and I. Sela. 1992. the conversion of a RFLP assay into PCR for the determination of purity in a hybrid pepper cultivar. *Euphytica* 62:97-102.

McDonald, M.B., L. J. Elliot, and P.M. Sweeney. 1994. DNA extraction from dry seeds for RAPD analysis in varietal identification studies. *Seed Sci. Tech.* 22:171-176

문지혜. 1996. 고추의 유전자적 응성불임성과 관련된 RAPD 마커 탐색에 관한 연구. 서울대학교 대학원 석사논문

Ohmori, T., M. Murata, and F. Motoyoshi. 1996. Molecular characterization of RAPD and SCAR markers linked to the Tm-1 locus in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 92:151-156.

Ozaki, T., T. Shimada, T. Nakanish, J. Yamamoto, and M. Yoshida. 1995. RAPD analysis for parentage determination in *Prunus mume* Sieb. et Zucc. *J. Japan. soc. Hort. Sci.* 64(2):235-242.

- Paran, I. and R.W. Michelmore. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85:985-993
- Saiki, R.K. 1990. Amplification of genomic DNA. In : PCR protocols : A guide to methods and applications. pp.13-20. Academic Press, Inc.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Chapter 6.
- Tanksley, S.D. and C.M. Rick. 1980. application of alcohol dehydrogenase allozymes in testing the genetic purity of F<sub>1</sub> hybrid of tomato. *Hort. Sci.* 16(2):178-181.
- Trangoonrung, S., V. Knazin, P.M. Hayes and T.K. Blake. 1992. Sequence-tagged site facilitated PCR for barley genome mapping. *Theor. Appl. Genet.* 84:1002-1008.
- Wang, H., M. and J.C. Adrian. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Res.* 21:4153-4154.
- Welch, J. and M. McClelland. 1990. fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18:7213-7218.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelic, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.
- Yang, X. and C. Quiros. 1993. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 86:205-212.
- Yu, K.F., A.V. Deynze, and K.P. Pauls. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis, In: *Methods in plant molecular biology and biotechnology*. CRC Press. Inc. pp287-300.
- Yu, K.F. and K.P. Pauls. 1994. Optimization of DNA-extraction and PCR procedures for random amplified DNA(RAPD) analysis in plants. In : *PCR technology*, Griffin, H.G. and A.M. Griffin(eds). CRC Press. pp193-200.