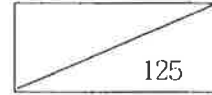


최 종  
연구보고서

GOVP1200134251

BSAGM0030015-2001053-3

625.0453



L 293 S

19

Superoxide Dismutase 고함유 과채류의 육종기술 개발

Development of vegetables to produce high yields of  
superoxide dismutase in fruits

연구기관

한국생명공학연구원

농 립 부



# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “Superoxide Dismutase 고함유 과채류의 육종기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001년 10월 31일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

총괄연구책임자 : 곽 상 수

연 구 원 : 이 행 순

연 구 원 : 권 석 윤

연 구 원 : 김 재 훈

연 구 원 : 김 기 연

연 구 원 : 박 수 영

연 구 원 : 신 승 용

연 구 원 : 최 선 미

연 구 원 : 정 유 정

연 구 원 : 박 은 정

연 구 원 : 권 은 정

연 구 원 : 한 수 경

위탁연구기관명 : 충청남도농업기술원

위탁연구책임자 : 우 인 식

연 구 원 : 이 은 모

연 구 원 : 송 남 현

연 구 원 : 조 만 현

연 구 원 : 김 현 숙

# 요 약 문

## I. 제 목

Superoxide dismutase 고함유 과채류의 육종기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

산소(O<sub>2</sub>)는 식물체를 포함한 호기성 생명체의 생명 유지에 가장 필요한 성분이다. 식물을 포함한 대부분의 생물은 지구환경악화에 따라 생기는 각종 환경스트레스를 받으면 생체내 산소는 전자(electron)와 반응하면서 superoxide anion radical ( $\cdot O_2^-$ ), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ) 등의 반응성이 높은 독성의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 변한다. 이들 ROS는 강한 산화력을 가지고 있어 지질 과산화, 세포막 분해, 단백질 분해, DNA 합성저해, 광합성 억제, 엽록소 파괴, 노화 촉진 등 생체내에서 생리적 장애를 주며 심할 경우 세포사멸을 초래한다.

Superoxide dismutase (SOD)는 산소를 소비하는 모든 생물종에 존재하며 생체내에서 활성산소장애에 대한 방어작용을 하는 대표적인 활성산소 저해제로서 조직장애를 일으키는 superoxide radical ( $\cdot O_2^-$ )을 분해하며 살균성 물질인 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)를 생성하여 조직을 보호하기 때문에, 항담증제로서 관절염, 류마티즈 등에 유효할 뿐 아니라 허혈성심질환(虛血性心疾患), 방사선 장애방지 등에 유효성이 인정되어 SOD 의약품 개발이 활발히 진행되고 있다.

SOD는 일본의 경우에서만, 활성산소저해제의 대상이 되는 허혈성심질환자는 약 2만명, 만성관절염류마치즈환자는 약 5만5천명, 병원에서 치료를 받고 있는 화상환자는 1만5천명 정도로 일본에서의 SOD의 시장규모는 연간 1억\$ 이상으로 추정되고 있으며 국내에서 SOD는 주로 피부의 노화방지와 체내의 유해산소 제

거작용을 위한 화장품의 첨가제로 1988년부터 사용되고 있으며, 국내시장은 약 10억원이며 이중 70%는 수입에 의존하고 있음. 국내에서도 향후 의약품, 식품 등의 용도로 SOD제품이 개발되면 시장은 매우 클 것으로 예측된다.

현대인은 많은 스트레스 여건에서 생활하고 있어 생체내에 독성의 활성산소 종이 많이 발생하고 있으며 이들 활성산소종을 적절히 제거하지 못하면 퇴행성 질병 등의 원인이 되고 있으며 최근 인체질병과 스트레스와 관련한 많은 연구에서 질병의 대부분은 활성산소가 원인이 되고 있음이 입증되고 있다. 생물의 노화 원인중에는 생체중의 활성산소가 중요하게 기인하는데, 노령화가 되면 외부 스트레스로 인해 유도되는 SOD유도능이 급속히 떨어진다. 따라서 외부로부터 SOD를 함유한 식품, 의약품의 적절한 공급이 필요하다고 판단된다.

SOD는 항염증제 등의 폭넓은 약효를 가진 의약품으로 기대되어 일본, 미국 등에서 연구개발이 활발히 진행되고 있는데, 의약품 SOD의 개발은 인체 SOD를 대장균을 숙주로 한 유전자재조합에 의해 SOD를 양산화하는 기술개발과 polyethylene glycerol, lecithin, liposom 등과 결합시켜 생체내에서의 수명 연장과 체내로의 이동을 용이하게 하는 연구를 중심으로 이루어지고 있다. 국내에서는 효모에서 화장품용으로 SOD를 생산하고 있으나 아직 식물로부터 SOD 생산과 SOD 형질전환식물체 개발에 관한 예가 보고된 바 없다. 피부에 바른 SOD가 자외선에 의해 손상된 피부에 대해 보호작용이 있으며 형광물질로 표식된 SOD가 피부표피층을 침투하여 피부에서 발생하는 활성산소종을 효율적으로 제거할 수 있음이 국제실험피부학회에 보고되었으며 MnSOD가 방사선에 노출된 동물세포를 보호하는 작용이 있음이 알려졌다.

SOD유전자를 도입한 형질전환식물체 개발에 관한 연구는 주로 제초제(파라quat 등), 오존, 저온 등 환경스트레스에 대한 내성기구 해석과 저항성식물 개발에 주력하여 1990년부터 보고되고 있으며 담배, 토마토, 감자, 목화 등이 개발되어 여러 가지 환경스트레스, 즉 산화적 스트레스에 내성을 나타내었다. SOD 고함유 식물체는 "plant bioreactor"로써 생체내의 유해 활성산소의 제거와 노화억제작용 등 기능성을 갖는 품종개발로 의약품, 화장품 등의 용도 외에

도 다양한 환경스트레스에 식물체가 잘 적응할 뿐 아니라, 수송에 따른 저장성도 향상될 것으로 기대된다. 또한 edible vaccine의 개념으로 SOD를 유전공학 적 기법에 의해 식물체로부터 생산하는 연구는 본 연구를 통해 고유성을 확보하는 것이 국제경쟁력을 강화하는 적극적인 방안이 될 수 있을 것이다.

따라서, 본 연구에서는 생식을 주로 하는 오이, 토마토 등의 과채류를 대상으로 효율적인 재분화 및 형질전환 시스템을 확립하고 더 나아가 SOD 유전자를 분리하여 오이 및 토마토에 도입함으로써 SOD를 고생산하는 품종을 개발하여 SOD 고함유 과채류를 식품, 의약품, 화장품 등의 용도로서 과채류의 부가가치를 높이고자 한다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

1. 오이의 식물체 재분화 시스템 확립
2. 카사바 배양세포로부터 SOD 유전자 분리 및 특성분석
3. SOD 고함유 형질전환 오이 식물체 개발
4. SOD 고함유 형질전환 토마토 식물체 개발
5. SOD 형질전환 과채류의 순화 및 포장적용시험

### IV. 연구결과 및 활용에 관한 건의

#### 1. 오이의 식물체 재분화 시스템 확립

##### 1) 기관발생 및 체세포배발생에 의한 오이의 재분화 시스템 확립

기내에서 무균 발아시킨 유식물체의 자엽절편과 하배축으로부터 기관발생 및 체세포배발생 경로를 통한 식물체 재분화 시스템을 개발하였다. 자엽절편을

1 mg/L zeatin과 0.1 mg/L IAA가 함유된 MS배지에서 4주간 배양하였을 때 shoot 형성이 가장 양호하였으며, shoot은 자엽절편의 기저부에서만 관찰되었다. 유도된 shoot을 0.2 mg/L NAA 첨가 배지에 옮겨 뿌리를 유도하였으며 완전한 소식물체로 발달시켰다. 낙합계 품종의 하배축을 1 mg/L 2,4-D 배지에 배양하여 배발생캘러스를 유도하였으며 성장조절제를 제거한 기본배지에서 체세포 배로 발달하였다. 기관발생 및 체세포배발생 경로로 유도된 소식물체의 잎이 2-3장 자랐을 때 화분에 옮겨 온실에서 훈화시켜 과실을 얻을 수 있는 성숙한 식물체로 발달하였다.

## 2) 하배축 절편체로부터 고빈도 부정아 형성에 의한 식물체 재분화

오이 유식물체를 하배축의 상단 일부분만 남기고 절단한 후 접합면이 2.0 mg/L zeatin이 첨가된 MS 배지에 접하도록 배양하였을 때 하배축 절단면으로부터 부정아가 유도되었다. 하배축 절단면으로부터 부정아 유도율은 자엽의 크기와 하배축의 길이에 따라 달랐다. 발아 3-5일째 유식물체의 두 개의 자엽중 1개를 제거하거나, 두 개의 자엽을 모두 1/2로 절단한 경우 유식물체의 하배축 절단면에서 부정아가 고빈도(약 80-90%)로 유도되었다. 또한 유식물체의 하배축 길이가 짧았을 때 (2-3 mm) 부정아 유도율이 높았고, 길수록 유도율이 현저하게 감소하고, 하배축의 길이가 6 mm 이상인 경우에는 부정아가 발생하는 대신 부정근이 유도되었다. 유식물체의 하배축에서 유도된 부정아는 자엽절편에서 유도된 부정아에서 나타나는 집단 왜소화 현상과 같은 비정상적인 형태가 거의 나타나지 않고, 대부분 정상적인 재분화 개체가 되었다.

## 2. 카사바 배양세포로부터 SOD 유전자 분리 및 특성분석

### 1) 카사바 배양세포로부터 cDNA library 제작 및 SOD 유전자 분리

카사바 (*Manihot esculenta* Crantz) 배양세포로부터 분리한 poly(A)<sup>+</sup> RNA로

부터 Uni-ZAP XR cloning kit를 사용하여 cDNA library를 제작하였으며 상동성이 높은 SOD cDNA 부분에서 합성된 PCR 산물을 probe로 하여 library를 스크리닝한 결과 한 개의 전장의 SOD cDNA, mSOD1을 분리하였다. 이것은 세포질 CuZnSOD로 801 bp, pI 5.84인 단백질을 구성하는 152개의 아미노산을 코드화하였다.

## 2) SOD cDNA의 발현특성 분석

카사바 배양세포로부터 분리한 mSOD1은 단일 copy로 존재하였으며 배양세포 및 식물체의 줄기와 뿌리의 저장기관에서 강하게 발현하는 반면 식물체의 잎과 엽병에서는 약하게 발현하였으나 뿌리에서는 전혀 발현하지 않았다. 세포배양 동안에 mSOD1은 정지기에 이르는 동안 강하게 발현하다가 그 이후에 거의 발현하지 않았다. 또한 식물체의 잎에 고온 스트레스를 주었을 때 강하게 발현하는 반면 저온에는 초기에는 영향을 받지 않다가 24시간 이후에 발현하였다. mSOD1은 산화적 스트레스원인 화합물등의 처리에 의해 발현이 유도되는 특징을 나타내었다.

## 3. SOD 고함유 형질전환 오이 식물체 개발

### 1) 오이의 형질전환 시스템 확립

오이의 형질전환 시스템을 확립하기 위하여 발아 7일째의 자엽절편에 완두콩 유래 MnSOD 유전자를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404의 매개로 형질전환시켰다. 1 mg/L zeatin, 0.1 mg/L IAA, 300 mg/L, claforan, 100 mg/L kanamycin이 함유된 선발배지에서 부정아를 유도한 후 1 주일 간격으로 계대배양하면서 kanamycin 저항성 개체를 선발하였다. 선발배지에서 배양 6주 후 kanamycin 저항성을 가진 부정아만을 절단하여 0.2 mg/L NAA가 함유된 발근배지에 옮겨 뿌리를 유도한 후 화분에서 순화시켰다. 소식물체의 잎에서 DNA를



분리하여 PCR로 분석한 결과 3개의 식물체에서 kanamycin 저항성 nptII 유전자가 존재함을 확인하여 SOD 유전자가 오이에 도입됨을 확인할 수 있었다. 이종한 개체의 과실에서 SOD 함량이 무처리 개체에 비해 약 3.2배 높았으며 native gel 전기영동에서 도입한 SOD isoenzyme 밴드가 강하게 검출되었다.

## 2) SOD 고함유 형질전환 오이식물체 개발

식물생체반응기의 개념으로 SOD를 과실에서 과량생산하는 형질전환 오이식물체를 개발하였다. 오이의 자엽절편체에 아그로박테리아를 매개로 하여 형질전환을 시도하였으며 과실에서 우세적으로 발현하는 오이의 ascorbate oxidase (ASO) 프로모터와 카사바 배양세포로부터 분리한 SOD 유전자가 Basta를 선발표지로 하는 pGPTV-Bar 벡터를 이용하였다. 배양 3-4 주에 Basta 저항성 shoot들이 선발배지(2 mg/L BA, 300 mg/L claforan, 2 mg/L Bastar을 포함한 MS 배지)에서 유도되었으며 이것들을 새로운 선발배지에 계대배양하였다. 6 주후에 뿌리유도배지(1 mg/L IAA, 300 mg/L claforan, 2 mg/L Bastar을 포함한 MS 배지)로 옮겨 소식물체로 키운다음 PCR로 형질전환체를 선발하였다. PCR 양성반응을 나타낸 형질전환 식물체들은 순화시킨 후 온실에서 성숙한 개체로 발달하였다. Southern 분석으로 형질전환 오이식물체는 1-2 copy씩 도입유전자가 존재함을 확인하였다. 도입한 SOD 유전자는 형질전환 식물체의 열매에서 강하게 발현하였지만 잎에서는 거의 발현하지 않았다. 또한 형질전환체의 열매에서 전체 SOD 활성은 비형질전환체의 열매에 비해 2.5배 높았으며 native gel 분석에서 새로운 SOD isoenzyme band가 확인되었다. 오이열매에서 과량의 SOD를 생산하는 형질전환 오이는 환경스트레스 내성 식물체로서의 기능이외에 화장품의 재료로 이용될 수 있는 기능성을 지닌 형질전환 식물체로 활용이 기대된다.

#### 4. SOD 고함유 형질전환 토마토 식물체 개발

토마토의 자엽절편체에 아그로박테리아를 매개로 하여 오이의 형질전환에 사용하였던 벡터와 동일한 것을 kanamycin 유전자를 선발표지로 한 pBI101 벡터를 이용하였다. 배양 4 주에 kanamycin에 저항성을 가진 shoot들이 선발배지(2 mg/L BA, 300 mg/L claforan, 100 mg/L kanamycin을 포함한 MS 배지)에서 유도되었으며, 배양 6 주후에 뿌리유도배지(1 mg/L IAA, 300 mg/L claforan, 100 mg/L kanamycin을 포함한 MS 배지)로 옮겨 소식물체로 키운 다음 PCR로 형질전환체를 선발하였다. PCR 양성반응을 나타낸 형질전환 식물체들은 순화시킨 후 온실에서 성숙한 개체로 발달하였다. Southern 분석으로 형질전환 오이식물체는 각각 1-3 copy씩 도입유전자가 존재함을 확인하였다. 형질전환체의 전체 SOD 활성은 비형질전환체에 비해 3.2배 높았으나 native gel 분석에서 새로운 SOD isoenzyme band는 확인되지 않았다.

#### 5. SOD 형질전환 과채류의 순화 및 포장적응시험

SOD 형질전환 오이 및 토마토 식물체의 순화, 포장적응성 및 주요형질에 대해 조사하였다. 형질전환 오이식물체의 경우 92% 순화율을, 토마토는 100%의 순화율을 보였으며 두 종류 모두 100%의 활착율을 나타내었다. 대부분의 형질전환 오이식물체는 형질전환시키지 않은 대조구와 마찬가지로 정상적인 생육상태를 보였으나 일부 개체는 절간이 매우 짧고 성장속도가 느리고 지제부에 잎이 총생하는 양상을 보였다. 형질전환 오이식물체는 타가수분에 의해서 임성을 지닌 종자를 채종할 수 있었다. 그러나 형질전환 토마토의 경우는 대조구에 비해 생육 및 결실상태가 큰 차이점이 없었으며 수확기 열과율이 낮아서 상품과 수확이 많았다.

## 6. 연구결과의 활용에 대한 건의

- 1) 본 연구에서 개발된 SOD 고함유 오이 (국내외 특허등록) 및 토마토는 노화 방지, 항염증작용 등의 기능성을 지닌 식품, 화장품 등의 소재로 활용이 기대되며 종묘회사등에 기술이전을 추진중이다.
- 2) 본 연구에서 확립한 오이식물체의 고빈도 재분화 시스템은 오이 이외 다른 박과작물의 식물체 재분화에 직접적인 활용이 가능할 것으로 기대된다.
- 3) 본 연구에서 분리하였거나 확보된 SOD 유전자, 과실우세 발현 프로모터, 형질전환 벡터는 환경스트레스 내성 식물체 개발뿐만 아니라 식물생체반응기의 개념으로 과실에서 유용단백질을 생산할 수 있는 형질전환 식물체 개발에 넓게 활용될 것이다.
- 4) 형질전환 오이식물체의 개발은 저온내성 뿐만 아니라 여러 가지 환경스트레스에 내성을 갖는 형질전환 오이식물체를 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

## SUMMARY

### I. Subject

Development of vegetables to produce high yields of superoxide dismutase in fruits

### II. Objective and Significance

Oxygen is essential for the existence of aerobic organisms, including plants, but toxic reactive oxygen species (ROS) such as superoxide radicals ( $\cdot O_2^-$ ), hydroxyl radicals ( $\cdot OH$ ), and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) are generated in a number of different ways during normal metabolic processes. In particular, ROS are overproduced in plant cells under environmental stress. Injury caused by ROS is known as oxidative stress. Oxidative stress is a major factor causing damage in plants exposed to environmental stress.

Superoxide dismutase (SOD; superoxide: superoxide oxidoreductase, EC1.15.1.1) constitutes the first line of cellular defense against oxidative stress. SOD is a metalloprotein that catalyzes the dismutation of superoxide radicals to hydrogen peroxide and oxygen. The enzyme is ubiquitous in aerobic organisms where it plays a major role in defense against ROS-mediated toxicity. Most plants contain a number of SOD isozymes that are located in various cellular compartments. Three classes of SOD have been identified based on the metals present at the active site. These are copper/zinc (CuZnSOD), iron (FeSOD), and manganese (MnSOD). CuZnSOD is generally found in the cytosol and the chloroplasts,

MnSOD is located in mitochondria, and FeSOD is present within the chloroplasts of some plants. CuZnSOD genes have been cloned and characterized from over 20 plants, including maize, rice, sweet potato, and red pepper. Comparison of SOD amino acid sequences has shown a great degree of similarity among plant species.

*In vitro* growth of plant cells takes place under high oxidative stress conditions. Thus, plant cell cultures are an excellent system for production of antioxidants and study of the antioxidative mechanism in plant cells. The physiological roles of antioxidant enzymes, including SOD, have not been greatly studied in plant cell cultures even though cell cultures are important in the field of plant biotechnology. We selected a cassava (*Manihot esculenta*) cell line for high yields of SOD.

Transgenic plants overexpressing SOD have been developed to reduce the oxidative damage in plants. In addition, SOD may be very useful in the field of medicinal, food and cosmetic industries. Development of the fruits of cucumber and tomato producing high yields of SOD as a plant bioreactor will be widely used. For this purpose, we focussed on an establishment of plant regeneration system, cloning of SOD cDNA from cassava cells, development of transgenic cucumber and tomato plants, and so on.

### III. Contents and Scope of Research

1. Establishment of plant regeneration system in cucumber
2. Isolation and characterization of SOD gene from cassava cells
3. Development of transgenic cucumbr plants producing high yield of SOD

4. Development of transgenic tomato plants overexpressing SOD
5. Acclimatization and field test of transgenic plants

#### IV. Results and Recommendation

##### 1. Establishment of plant regeneration system in cucumber

###### 1) Plant regeneration through organogenesis and somatic embryogenesis of cucumber

Cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants were regenerated through organogenesis and somatic embryogenesis in cotyledon and hypocotyl cultures. The shoots were efficiently formed on the basal region of cotyledons cultured on MS medium containing 1 mg/L zeatin and 0.1 mg/L IAA in all cultivars used. Embryogenic calli were formed on hypocotyl segments cultured on MS medium containing 1 mg/L 2,4-D in cv. group 'Nakhab' and maintained by consecutive subculture on the same medium every 2-3 weeks without loss of embryogenic ability. Upon transfer to MS basal medium, high frequency somatic embryogenesis was achieved easily from embryogenic callus. Regenerated plantlets through organogenesis and somatic embryogenesis were transplanted to pots and gradually acclimatized to greenhouse condition where they subsequently produced fruits.

###### 2) High frequency shoot induction and plant regeneration from cotyledonary hypocotyl explants of cucumber

A method of high frequency shoot induction was established using excised hypocotyl segments bearing cotyledons of cucumber seedlings.

Adventitious shoots were obtained from the upper excised hypocotyls of cucumber seedlings incubated on MS medium containing 2 mg/L zeatin. The effects of cotyledon size and hypocotyl length of seedlings on shoot organogenesis were also examined. A higher frequency (80-90%) of adventitious shoots was obtained from explants of 3- and 5-day-old seedlings with either 1 cotyledon or 2 half-cotyledons, and a short hypocotyl length (2 mm). However, explants with long hypocotyl explants were removed and rooted in MS medium containing 1 mg/L IAA. The rooted plantlets developed into normal plants after acclimatization to ambient humidity levels.

## 2. Molecular characterization and expression of a cDNA encoding CuZnSOD from cultured cells of cassava (*Manihot esculenta* Crantz)

### 1) Construction of a cDNA library and isolation of SOD cDNA

A cDNA library was constructed with poly(A)<sup>+</sup> RNA from cultured cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cells using a Uni-ZAP XR cloning kit (Stratagene) following the protocol supplied. The primers were prepared based on the highly conserved region reported for SOD sequences from other plant species. These primer were used for PCR amplification of SOD cDNA. The cDNA encoding cytosolic copper/zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) *mSOD1* was cloned and characterized from cell cultures of cassava which produced a high yield of SOD. *mSOD1* encoded 152 amino acid polypeptides with a pI value of 5.84.

### 2) Differential expression of *mSOD1* gene

Southern blot analysis using a *mSOD1* specific probe indicated that a single copy of the *mSOD1* gene was present in the cassava genome. The *mSOD1* gene was highly expressed in cultured cells, as well as in intact stems and tuberous roots. It was expressed at a low level in leaves and petioles. Transcripts of *mSOD1* were not detected in nontuberous roots. During cell growth, transcription activity was at a high level during the stationary growth stage and sharply decreased after further culturing. The *mSOD1* gene in excised cassava leaves responded to various stresses in different ways. These stresses included temperature change and exposure to stress inducing chemicals. Transcript levels of *mSOD1* increased dramatically a few hours after heat stress at 37°C and showed a synergistic effect with wounding stress. Levels decreased in response to chilling stress at 4°C and showed an antagonistic effect with wounding stress. The gene was induced by ABA, ethephon, NaCl, sucrose, and methyl viologen. These results indicate that the *mSOD1* gene is involved in the antioxidative mechanism in response to oxidative stress induced by environmental change.

### 3. Development of transgenic cucumber producing high yields of SOD

#### 1) Establishment of genetic transformation system in cucumber

To establish the fruits of cucumber producing high yields of SOD, the MnSOD cDNA from pea under the control of the CaMV 35S promoter was introduced into cucumber using *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404-mediated transformation. The kanamycin-resistant shoots were selected on the MS



medium containing 1 mg/L zeatin, 0.1 mg/L IAA, 300 mg/L claforan, and 100 mg/L kanamycin. After 6 weeks of cultures on the selection medium, the shoots were transferred to MS medium containing 0.2 mg/L NAA to induce roots. PCR analysis using the primers for nptII gene revealed that three plantlets were transformed. The fruits of one transgenic plant had approximately 3.2-fold higher SOD activity than those of non-transgenic plants. MnSOD isoenzyme band was strongly detected on native gel in fruits of transgenic plants.

## 2) Development of transgenic cucumber producing high yields of SOD

Transgenic plants overexpressing SOD have been developed to reduce the oxidative damage in plants. In addition, SOD may be very useful in the field of medicinal, food and cosmetic industries. In this report, to develop the fruits of cucumber producing high yields of SOD as a plant bioreactor, the SOD cDNA (mSOD1) was introduced into cucumber. For this we designed a new vector system, pGPTV-Bar harboring ascorbate oxidase promoter expressing dominantly in cucumber fruits, mSOD1 isolated from cultured cells of cassava, and bar gene as a selectable marker. The excised cotyledon segments of cucumber seedlings were cocultured with *A. tumefaciens* carrying the vector. The Bastar-resistant shoots were selected on the MS medium containing 2 mg/L BA, 300 mg/L claforan, and 2 mg/L Bastar. After 6 weeks of cultures on the selection medium, the shoots were transferred to MS medium containing 1 mg/L IAA, 300 mg/L claforan, and 2 mg/L Bastar to induce roots. Southern blot analysis confirmed that the mSOD1 gene was integrated in the nuclear genomes of the cucumber. The mSOD1 gene is highly expressed in the transgenic

cucumber fruits. It is expressed at a low level in the transgenic leaves. The fruits of transgenic plants had approximately 2.5-fold higher SOD activity than those of non-transgenic plants. The cucumber fruits overexpressing SOD will be useful for cosmetic and medicinal materials.

#### 4. Development of transgenic tomato plants

To develop the fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum*) producing high yields of SOD as a plant bioreactor, the SOD cDNA was introduced into tomato using *Agrobacterium*-mediated transformation. For this we designed a new vector system, ASOp + mSOD1/pBI101, harboring ascorbate oxidase (ASO) promoter expressing dominantly in cucumber fruits, SOD cDNA isolated from cultured cells of cassava, and *nptII* gene as a selectable marker. The cotyledon segments of tomato seedlings were cocultivated with *A. tumefaciens* carrying the vector. The kanamycin-resistant shoots were selected on the MS medium containing 2 mg/L BA, 0.1 mg/L IAA, 300 mg/L claforan, and 100 mg/L kanamycin. After 6 weeks of cultures on the selection medium, the shoots were transferred to MS medium containing 1 mg/L IAA, 300 mg/L claforan and 200 mg/L kanamycin to induce roots. PCR and Southern analysis confirmed that the mSOD1 gene was incorporated into the tomato genomic DNA of three regenerants.

#### 5. Acclimatization and field test of transgenic fruit plants

Transgenic cucumber and tomato plants were grown in a green house and investigated the acclimatization and field test. Transgenic plants showed 92%, and 100% of acclimatization in cucumber and tomato, respectively.

Most transgenic cucumber plants were normally grown, a few plants showed abnormality such as slow growth, very short node intervals. Fertile seeds were harvested following cross-pollination in transgenic cucumber plants. The phenotype, growth, and seeding of transgenic tomato plants was similar to non-transgenic plants.

## 6. Application of the results

- 1) Transgenic cucumber (Korea and international patent filed) and tomato fruits developed in this study could be used as new materials of food and cosmetics with new functions of antiaging and so on. The technology transfer to bioindustries including seed company is under way.
- 2) Plant regeneration system via somatic embryogenesis and organogenesis established in this study could be applied to mass production in useful plants. Furthermore genetic transformation of useful plants could be possible.
- 3) Gene and vector including SOD, ASO promoter, plant expression vector developed in this study could be applied to development of environmental stress-resistant transgenic plants and plant bioreactor to produce important biomaterials.
- 4) Development of transgenic cucumber plants will be applied to cold stress-tolerant cucumber.

# CONTENTS

Chapter 1 Introduction .....	23
Section 1 Background and Significance .....	23
1. Technological View .....	23
2. Ecological & Industrial View .....	25
3. Social & Cultural View .....	27
Section 2 Objective and Scope of Research .....	27
1. Objective .....	27
2. Scope .....	28
Chapter 2 Plant Regeneration System of cucumber .....	29
Section 1 Introduction .....	29
Section 2 Establishment of plant regeneration in cucumber ....	30
1. Plant regeneration via organogenesis .....	30
2. Plant regeneration via somatic embryogenesis .....	32
Section 3 High frequency plant regeneration from cotyledonary hypocotyl explants of cucumber seedling .....	34
1. Plant regeneration from cotyledonary hypocotyl explants .....	34
2. Factors of shoot induction from hypocotyl explants .....	35
Chapter 3 Cloning and Analysis of SOD cDNA .....	43
Section 1 Introduction .....	43
Section 2 Isolation and characterization of SOD cDNA .....	44
1. Construction of cDNA library from culture cells of cassava and isolation of SOD cDNA .....	44
2. Analysis of SOD cDNA .....	45

3. Expression and characterization of mSOD1 .....	48
Chapter 4 Development of transgenic cucumber plants	
producing high levels of SOD .....	55
Section 1 Introduction .....	55
Section 2 Transformation system of cucumber .....	56
1. <i>Agrobacterium</i> -mediated transformation .....	56
2. Confirmation and expression of SOD gene .....	58
Section 3 Development of SOD transgenic cucumber .....	62
1. Construction of fruit-dominant expression vector .....	62
2. Development of transgenic cucumber plants .....	64
Chapter 5 Development of transgenic tomato plants .....	73
Section 1 Introduction .....	73
Section 2 Development of transgenic tomato plants .....	74
1. Plant regeneration of tomato .....	74
2. Analysis of transgenic tomato plants .....	75
Contract Subject .....	83
Section 1 Introduction .....	83
Section 2 Field test of transgenic cucumber plants .....	84
Section 3 Field test of transgenic tomato plants .....	91
Results : List of patents and publications .....	96
References .....	98

# 목 차

제 1 장 서 론 .....	23
제 1 절 연구개발의 필요성 .....	23
1. 기술적 측면 .....	23
2. 경제·산업적 측면 .....	25
3. 사회·문화적 측면 .....	27
제 2 절 연구개발의 목적과 범위 .....	27
1. 연구개발의 목적 .....	27
2. 연구개발의 범위 .....	28
제 2 장 오이 식물체 재분화 시스템 확립 .....	29
제 1 절 서 설 .....	29
제 2 절 체세포배발생 및 기관발생에 의한 식물체 재분화 .....	30
1. 기관발생에 의한 오이의 식물체 재분화 .....	30
2. 체세포배발생에 의한 오이의 식물체 재분화 .....	32
제 3 절 하배축 배양에 의한 오이의 고빈도 식물체 재분화 시스템 개발 .....	34
1. 하배축 절단면으로부터 부정아 유도 및 식물체 재분화 .....	34
2. 고빈도 부정아 유도에 영향을 미치는 요인 .....	35
제 3 장 카사바 배양세포로부터 SOD 유전자 분리 및 특성분석	43
제 1 절 서 설 .....	43
제 2 절 카사바 배양세포로부터 SOD cDNA 분리 및 특성분석 .....	44
1. 카사바 배양세포로부터 cDNA library 작성 및 SOD cDNA 분리 .....	44

2. SOD cDNA 염기서열 분석 .....	45
3. mSOD1의 발현 및 특성분석 .....	48
<b>제 4 장 SOD 고함유 형질전환 오이식물체 개발 .....</b>	<b>55</b>
제 1 절 서 설 .....	55
제 2 절 오이의 형질전환 시스템 확립 .....	56
1. Agrobacterium에 의한 오이의 형질전환 .....	56
2. SOD 유전자의 확인 및 발현 .....	58
제 3 절 SOD 고함유 형질전환 오이식물체 개발 .....	62
1. 과실우세발현 ASO 프로모터를 이용한 SOD 형질전환 벡터 제작 .....	62
2. SOD 형질전환 오이 개발 및 분석 .....	64
<b>제 5 장 SOD 고함유 형질전환 토마토 개발 .....</b>	<b>73</b>
제1절 서 설 .....	73
제2절 형질전환 토마토 개발 .....	74
1. 토마토 식물체 재분화 .....	74
2. 형질전환 토마토 식물체 개발 및 분석 .....	75
<b>SOD 형질전환 과채류의 순화 및 포장적응시험 .....</b>	<b>83</b>
제1절 서 설 .....	83
제2절 SOD 형질전환 오이식물체의 생육특성 .....	84
제4절 SOD 형질전환 토마토의 생육특성 및 생산성검정 .....	91
<b>연구성과 : 특허 및 논문 목록 .....</b>	<b>96</b>
<b>참고문헌 .....</b>	<b>98</b>

# 여 백



# 제 1 장 서 론

## 제 1 절 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

Superoxide dismutase (SOD)는 산소를 소비하는 모든 생물종(식물, 동물, 미생물 등)에 존재하며  $2H^+ + 2\cdot O_2^- \rightarrow H_2O_2 + O_2$ 의 반응을 촉매하여 생체내에서 활성산소장해에 대한 방어작용을 하는 대표적인 활성산소 저해제이다. SOD는 함유하고 있는 금속의 종류에 따라 CuZnSOD, MnSOD, FeSOD의 3종이 있으며, 주로 CuZnSOD는 세포질과 엽록체에, MnSOD는 미토콘드리아에 그리고 FeSOD는 식물의 엽록체에 존재한다고 보고되어 있다.

식물을 포함한 대부분의 생물은 병충해와 같은 생물학적 스트레스 뿐만 아니라 다양한 종류의 환경스트레스를 받으면, 생체내에서 생명의 필수원소인 산소( $O_2$ )가 superoxide radical( $\cdot O_2^-$ ), hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ) 등의 반응성이 높은 독성의 활성산소종으로 변하게 된다. 이들은 강한 산화력을 가지고 있어 세포막분해, 단백질분해, DNA합성억제 등 생체내에서 심각한 생리적인 장애를 주며 심할 경우는 생명을 잃게 하며, 질병의 90%는 활성산소가 원인이라고 할 정도로 활성산소 장애는 심각하다.

생체내의 활성산소제거 시스템에 관여하는 물질로서는 SOD 등의 항산화효소와 비타민C 등의 저분자 항산화물질이 있으며, 특히 SOD는 조직장해를 일으키는 superoxide radical ( $\cdot O_2^-$ )을 분해하며 살균성 물질인 과산화수소( $H_2O_2$ )를 생성하여 조직을 보호하기 때문에, 항담증제로서 관절염, 류마티즈 등에 유효할 뿐 아니라 허혈성심질환, 방사선 장애방지 등에 유효성이 인정되어 SOD의약품 개발이 활발히 진행되고 있다. 또한 SOD는 국내에서도 노화방지의 효과가 인정되어 화장품의 첨가제로 사용되고 있다.

현대인은 많은 스트레스 여건에서 생활하고 있어 생체내에 독성의 활성산소 종이 많이 발생하고 있으며 이들 활성산소종을 적절히 제거하지 못하면 퇴행성 질병 등의 원인이 되고 있으며 최근 인체질병과 스트레스와 관련한 많은 연구에서 질병의 대부분은 활성산소가 원인이 되고 있음이 입증되고 있다. 생물의 노화 원인중에는 생체중의 활성산소가 중요하게 기인하는데, 노령화가 되면 외부 스트레스로 인해 유도되는 SOD유도능이 급속히 떨어진다. 따라서 외부로부터 SOD를 함유한 식품, 의약품의 적절한 공급이 필요하다고 판단된다.

SOD는 항염증제 등의 폭넓은 약효를 가진 의약품으로 기대되어 일본, 미국 등에서 연구개발이 활발히 진행되고 있는데, 의약품 SOD의 개발은 인체 SOD를 대장균을 숙주로 한 유전자재조합에 의해 SOD를 양산화하는 기술개발과 polyethylene glycerol, lecithin, liposom 등과 결합시켜 생체내에서의 수명 연장 및 체내로의 이동을 용이하게 하는 연구를 중심으로 수행하고 있음. 그러나 식물을 대상으로 SOD의 대량생산연구는 거의 보고된 바 없다.

피부에 바른 SOD가 자외선에 의해 손상된 피부에 대해 보호작용이 있으며 형광물질로 표식된 SOD가 피부표피층을 침투하여 피부에서 발생하는 활성산소종을 효율적으로 제거할 수 있음이 국제실험피부학회에 보고되었으며, MnSOD가 방사선에 노출된 동물세포를 보호하는 작용이 있음이 알려졌다.

SOD유전자를 도입한 형질전환식물체 개발에 관한 연구는 주로 제초제(파라quat 등), 오존, 저온 등 환경스트레스에 대한 내성기구 해석과 저항성식물 개발에 주력하여 1990년부터 보고되고 있다. 담배 미토콘드리아 유래의 MnSOD를 도입한 형질전환담배에서 제초제 파라quat에 의한 산화적인 스트레스를 경감시켰으며 담배의 MnSOD를 도입한 알파파는 SOD활성증가에 의해 freezing스트레스 후의 생장회복이 촉진되었다. 또한 담배의 SOD를 엽록체에 대량발현시킨 결과, 오존의 피해를 3-4배 적게 받았다.

완두콩 엽록체 유래 CuZnSOD를 도입한 형질전환 담배는 정상식물보다 약 3배의 SOD활성과 3-4배의 ascorbate peroxidase활성을 나타내어, 강한 광, 저온 및 파라quat에 의한 산화적인 스트레스에 내성을 보였으며, 엽록체 유래 MnSOD를

도입한 목화는 저온스트레스에 내성을 나타내었다. 토마토 CuZnSOD을 감자에 도입시켜서 파라콧에 의한 산화적인 스트레스를 경감시켰다.

국내에서 SOD의 개발현황은 (주)럭키가 사람의 CuZnSOD를 효모에서 화장품 용으로 생산(1993년, 1300 Kg)하여 자체 소비할 정도이며, 아직 식물로부터 SOD생산과 SOD 형질전환식물체 개발에 관한 예가 보고된 바 없다. 한편 농업의 국제개방화에 따른 첨단농업 적합형 품종개발은 대단히 중요한 국가적인 사업으로 본 연구에서 목표로하는 SOD 고함유 오이는 "plant bioreactor"로써 생체 내의 유해 활성산소의 제거와 노화억제작용 등 고도의 기능성을 갖는 품종개발로 현대사회가 안고 있는 생활스트레스와 고령화사회에 적합한 과제로 앞으로의 전망은 매우 밝다고 판단된다.

SOD 고함유 식물체는 의약품, 화장품 등의 용도 외에도 다양한 환경스트레스에 식물체가 잘 적응할 뿐 아니라, SOD 고함유 오이는 수송에 따른 저장성도 향상될 것으로 기대되며 Edible vaccine의 개념으로 SOD를 유전공학적인 기법에 의해 식물체로부터 생산하는 연구는 본 연구를 통해 고유성을 확보하는 것이 국제경쟁력을 강화하는 적극적인 방안이 될 수 있을 것이다.

따라서, 본 연구에서는 생식을 주로 하는 오이, 토마토 등의 과채류를 대상으로, SOD을 고생산하는 품종을 개발하여 SOD 고함유 과채류를 식품, 의약품, 화장품 등의 용도로 개발하여 과채류의 부가가치를 높이고자 한다.

## 2. 경제·산업적 측면

SOD는 생체내에서 활성산소의 독성으로부터 생체를 보호하는 작용으로 항염증제로서 관절염, 류마티스에 유효할 뿐 아니라 베체트병, 허혈성심질환, 교원병 등에 대해서도 그 유효성이 기대되고 있어, 일본과 미국의 제약회사에서는 SOD의약품을 개발중에 있다. 일본의 경우에서만, 활성산소저해제의 대상이 되는 허혈성심질환자는 약 2만명, 만성관절염류마치즈환자는 약 5만5천명, 병원에서 치료를 받고 있는 화상환자는 1만5천명이며, 일본에서의 SOD의 시장규모

는 연간 1억\$ 이상으로 추정되고 있다.

국내에서 SOD는 주로 피부의 노화방지와 체내의 유해산소 제거작용을 위한 화장품의 첨가제로 1988년부터 사용되고 있으며, 국내시장은 약 10억원이며 이 중 70%는 수입에 의존하고 있으며 국내에서도 향후 의약품, 식품 등의 용도로 SOD제품이 개발되면 시장은 매우 클 것으로 예측된다.

본 연구에서 SOD 유전자의 도입대상으로 하는 오이 등의 주요 과채류의 국, 내외 생산현황은 다음 표와 같다.

M/T = 1,000ton

작 물	세 계 <sup>a</sup>		한 국 <sup>b</sup>		
	재배면적 (천 ha)	생 산 량 (M/T 천톤)	재배면적 ( ha)	생 산 량 (M/T 천톤)	추정생산액 (백만원)
토마토	978	70,623	3,619	148.7	148,000
오 이	1,178	18,326	8,710	303.4	242,720
고 추	1,224	10,630	88,871	176.3	528,900
수 박	1,763	27,063	27,185	635.4	826,020
호 박	650	8,019	7,512	152.4	30,480
참 외	777	12,976	10,251	258.1	645,250
메 론	-	-	359	8.5	1,700
가 지	554	8,682	-	-	-
딸 기	75	2,305	7,425	151.3	302,600
계	7,199	158,624	153,932	1,834.1	2,725,670

<sup>a</sup>FAO 통계자료 (1993년)

<sup>b</sup>한국 농림수산부 통계자료 (1994년)

따라서 SOD 고함유 오이가 개발되면 생체의 노화방지와 유해산소 제거를 위한 식품, 의약품, 화장품 등의 다양한 용도로 활용이 기대되며, 미국과 유럽에서는 이에 대한 기초연구가 활발하게 진행되고 있는 점을 고려해 볼 때 우리 농산물의 국제경쟁력을 강화시킬 수 있으리라 기대된다.

### 3. 사회·문화적 측면

현대인은 많은 스트레스 여건에서 생활하고 있어 생체내에 독성의 활성산소종이 많이 발생하고 있으며 이들 활성산소종을 적절히 제거하지 못하면 퇴행성 질병 등의 원인이 된다. 최근 인체질병과 스트레스와 관련한 많은 연구에서 질병의 대부분은 활성산소가 원인이 되고 있음이 입증되고 있다. 또한 도래하는 노령화시대에 대비하여 노화방지 및 퇴행성질병에 대한 대책마련이 시급한 실정이다. 생물의 노화 원인중에는 생체중의 활성산소가 중요하게 기인하는데, 노령화가 되면 외부 스트레스로 인해 유도되는 SOD유도능이 급속히 떨어진다고 한다. 따라서 외부로부터 SOD를 함유한 식품, 의약품의 적절한 공급이 필요하다.

따라서 본 연구의 목적인 SOD 고함유 오이의 개발은 고도의 기능을 가진 식품으로서 국민건강과 인류복지에 크게 기여할 것으로 사료된다.

## 제 2 절 연구개발의 목적과 범위

### 1. 연구개발의 목적

농업의 국제개방화에 따른 첨단농업 적합형 품종개발은 대단히 중요한 국가적인 사업이며 본 연구에서 목표로하는 SOD 고함유 오이는 "plant bioreactor" 로써 생체내의 유해 활성산소의 제거와 노화억제작용 등 고도의 기능성을 갖는 품종개발로 현대사회가 안고 있는 생활스트레스와 고령화사회에 적합한 과제로 앞으로의 전망은 매우 밝은 편이다. 또한 SOD 고함유 식물체는 의약품, 화장품 등의 용도 외에도 다양한 환경스트레스에 식물체가 잘 적응할 뿐 아니라, SOD 고함유 오이는 수송에 따른 저장성도 향상될 것으로 기대되고 있다.

피부에 바른 SOD가 자외선에 의해 손상된 피부에 대해 보호작용이 있으며

형광물질로 표식된 SOD가 피부표피층을 침투하여 피부에서 발생하는 활성산소종을 효율적으로 제거할 수 있음이 국제실험피부학회에 보고(Filipe et al., 1997)되었으며 MnSOD가 방사선에 노출된 동물세포를 보호하는 작용이 있음(Sun et al., 1998)이 보고되었다. 또한 SOD는 구강(입)내에 있는 세균들에 의해 초래되는 각종 질환들에 대한 치료효과제로 기대된다. 이러한 맥락에서 의약품, 식품, 화장품 등의 소재로 중요한 SOD가 오이, 토마토 등의 과채류에 도입하여 고부가가치 과채류를 생산함으로써 농가소득 증대와 국민복지에 기여할 것이다.

따라서 본 연구에서는 과채류(오이, 토마토)에 SOD 유전자를 도입하여 생체내 독성의 활성산소종을 제거하고 노화방지의 기능을 갖는 고부가가치의 과채류(오이, 토마토) 품종 개발하고자 한다.

## 2. 연구개발의 범위

### 1) 오이의 식물체재분화 시스템 확립

- 기관발생 및 체세포배발생에 의한 식물체 재분화
- 하배축 배양에 의한 오이의 고빈도 식물체 재분화 시스템 개발

### 2) 카사바 배양세포주로부터 SOD cDNA 분리 및 특성분석

- 카사바 배양세포주로부터 cDNA library 작성 및 SOD cDNA 분리
- SOD cDNA의 염기서열 분석
- mSOD1의 발현 및 특성분석

### 3) SOD 고생산 오이 개발

- 오이의 형질전환 시스템 확립
- SOD 고생산 오이 개발

### 4) SOD 고생산 토마토 개발

### 5) SOD 형질전환 과채류의 순화 및 포장적응시험

## 제 2 장 오이 식물체 재분화 시스템 확립

### 제1절 서 설

과채류는 90% 이상이 수분으로서, 저 칼로리 식품일 뿐만 아니라 무기염류와 비타민류의 중요한 공급원으로 이용되고 있다. 특히 오이(*Cucumis sativus* L.)는 과채류 중에서도 알칼리도가 높아 산성식품을 주로 섭취하는 우리 식생활의 균형을 위해 유용한 것으로 평가되고 있다.

지금까지 고품질 오이개발을 위한 조직배양 연구가 많이 수행되어 하배축(Rajasekaran et al., 1983), 잎(Chee and Tricoli, 1988), 자엽(Cade et al., 1987; Gambley and Dodd, 1990), 화분(Lazarte and Sasser, 1982), 원형질체(Jia et al., 1986; Colijn-Hooymans et al., 1988), 배발생캘러스(Jeong et al., 1999) 등의 배양으로부터 식물체 재분화가 보고되고 있다. 그러나 이와 같은 보고에도 불구하고 여전히 낮은 비율의 식물체 재분화 및 생존율, 비정상적인 형태형성, 조기개화 등 많은 문제점이 나타났다(Ziv and Gadasi, 1986; Kim et al., 1988; Gambley and Dodd, 1991).

일반적으로 유식물체를 배양재료로 사용할 경우 하배축 및 자엽 절편을 사용하는 경우가 많은데, 이는 이들 조직의 세포가 조직학적으로 어리고, 분화능이 높기 때문이다(Rajasekaran et al., 1983; Cade et al., 1987; Kim et al., 1988; Dong and Jia, 1991). 오이(*Cucumis sativus* L.)를 포함한 박과(Cucurbitaceae) 식물의 경우에도 하배축 및 자엽 절편을 사용하여 부정아를 유도한 연구가 많이 이루어진 바 있다(Gambley and Dodd, 1990; Dong and Jia, 1991; Gambley and Dodd, 1991; Colijn-Hooymans et al., 1994).

그러나 박과 식물의 하배축 및 자엽 절편을 배양할 경우 같은 조건에서도 품종과 연구자에 따라 부정아 유도율이 현저하게 다르고(Dong and Jia, 1991; Colijn-Hooymans et al., 1994), 자엽의 기저부에서 부정아가 유도될 때 잎이

집단적으로 발생하여 분열조직이 집단 왜소화하여 생장이 정지되는 현상이 나타나는 경우가 많다(Gambley and Dodd, 1991; Dong and Jia, 1991). 따라서 모든 품종에서 정상적인 형태로 발달할 수 있는 부정아를 유도할 수 있는 개선된 조직배양 방법이 개발되어야 할 것이다.

국내에서도 여러 오이 품종을 대상으로 조직배양에 의한 식물체 재분화에 대해 체계적인 연구 보고가 미비한 실정이다. 따라서 조직배양에 의해 정상적인 형태로 발달하는 오이개체를 얻기 위하여 개선된 재분화 방법이 요구된다. 특히 본 연구에서는 오이의 절단된 하배축을 가진 유식물체를 배양하여 고빈도의 부정아를 하배축 절단면으로부터 유도할 수 있는 새로운 방법을 개발하였다.

## 제2절 체세포배발생 및 기관발생에 의한 식물체 재분화

### 1. 기관발생에 의한 오이의 식물체 재분화

오이종자(여름삼척, 은성백다다기, 백봉다다기, 조생낙합, 장형낙합)를 증류수에 1시간 동안 침지시킨 후 75% 에탄올에 1분간 표면살균한 다음 2% sodium hypochlorite 용액에서 15분간 2차 멸균시킨 후 멸균수로 3회 세척하였다. 멸균 처리된 종자는 생장조절물질이 첨가되지 않은 MS (Murashige and Skoog, 1962) 배지에서 발아시켰다. 종자 발아조건은 약  $15 \mu\text{M}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 의 형광 빛에서 16시간, 암 8시간의 광주기,  $25^\circ\text{C}$ 이었다. 발아 7일째의 자엽의 기저부와 상층부를 절단하여 중심부(5 x 5 mm)만을 배양하였다(Fig. 1A). 자엽절편 배양을 위한 배지조성은 MS배지에 3% sucrose, 0.4% Phytigel를 첨가한 후 cytokinin (zeatin, BA, kinetin)과 IAA를 조합 처리하여 4 주간 배양한 다음 부정아(shoot) 발생률을 조사하였다.

오이 자엽으로부터의 부정아 유도율은 발아 일수와 관련이 있으며 5일째 후



은 7일째의 자엽절편을 사용하였을 때 부정아 유도율이 높았다. 발아 7일째의 자엽절편은 zeatin과 IAA 함유배지에서 부정아 형성율이 11-22%로 양호하였다 (Table 1). BA 배지에서도 부정아는 유도되었지만 이들은 생장이 잘 되지 않고 잎이 비후하여 정상적인 식물체로 거의 발달하지 못하였다.

부정아 유도는 자엽절편의 절단면인 기저부에서만 이루어졌으며, 그 이외의 부분에서는 전혀 유도되지 않았는데(Fig. 1B) 이것은 Gambley와 Dodd (1990)의 보고와 일치하였다. 따라서 오이 자엽절편 배양에 있어서 식물체 재분화능은 조직상태 및 조직부위의 특이성이 있는 것으로 사료된다.

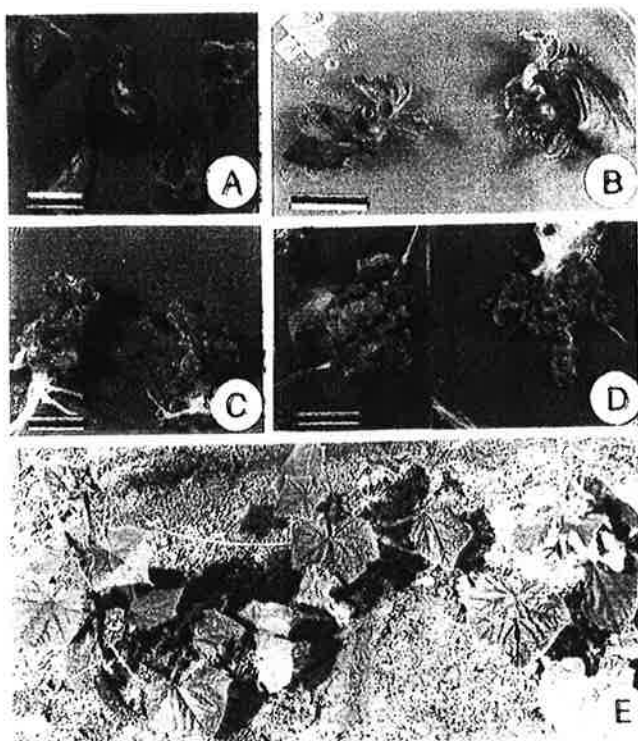


Fig. 1. Plant regeneration by organogenesis from cotyledon cultures of cucumber (*Cucumis sativus* L.). A: Cotyledons cultured on MS medium containing 1 mg/L zeatin and 0.1 mg/L IAA. B: Shoots induced from cotyledon explants. C: Plantlets with roots and shoots. D: Shoots showing morphological abnormality. E: Regenerated plants growing in a green house. Bars = 10 mm

Table 1. Effect of plant growth regulators on shoot formation from cultured cotyledons of cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Eunsung Bakdadagi) after 4 weeks of culture.

BA	MS medium + (mg/L)			Number of cotyledons used	Number of shoots (%)
	kinetin	zeatin	IAA		
1.0				315	4(1.3)
1.0			0.1	720	32(4.4)
	1.0			210	0(0)
	1.0		0.1	345	7(2.0)
		1.0		324	11(3.4)
		1.0	0.1	379	46(12.1)
		1.0	0.2	251	27(10.7)
	3.0		0.2	227	13(5.7)

자엽절편의 기저부에서 유도된 부정아를 0.2 mg/L NAA가 첨가된 MS배지로 옮겨 뿌리를 유도하였다(Fig. 1C). 일부 부정아들은 서로 뭉쳐 동시에 발생하여 줄기가 발달되지 않고 잎이 여러 겹으로 말리면서 소식물체로 발달하지 못하였다(Fig. 1D). 이러한 현상은 부정아가 자엽 기저부에서 집단적으로 발생하여 분열조직이 분리되지 않아 각각의 부정아가 독립된 분열조직을 갖추지 못했기 때문으로 사료된다.

뿌리가 잘 발달하고 잎이 2-3장 나온 소식물체는 원예용 상토의 화분에 옮겨 약 80% 습도를 유지하면서 순화시켰다. 재분화된 식물체는 온실로 옮겨 정식하였을 때 정상적인 식물체로 성장하여 과실을 얻을 수 있었다(Fig. 1E).

## 2. 체세포배발생에 의한 오이의 식물체 재분화

암소에서 발아 5일째 유식물체의 하배축을 절단하여 (길이 5-10 mm) 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS배지에 배양하였다. 배양 42 주 후 거의 대부분의 하배축 절편으로부터 흰색의 캘러스가 유도되었고 이로부터 연노랑색의 캘러스도 드물게

유도되었다. 연노랑색의 캘러스만을 분리하여 계대배양하면 배지의 접합면에서 점성이 강하고 투명한 캘러스가 형성되는데 이들로부터 노랑색의 배발생캘러스가 유도되었다(Fig. 2A). 이러한 배발생캘러스는 암소에서 3% sucrose 배지에 배양하였을 때 하배축 재료의 2.3% 정도의 낮은 빈도로 낙합계(조생낙합, 장형낙합) 품종에서만 유도되었다. 이와같이 점액성의 투명한 캘러스로부터 배발생캘러스가 유도되는 것은 지금까지 보고된 식물의 경우와는 다른 결과이다.

배발생캘러스는 계대배양을 2-3회 더 실시하였을 때 점점 진한 노랑색으로 변화하였으며(Fig. 2B), 이들은 2,4-D를 제거한 MS배지에 옮겨주었을 때 약 1 주 후부터 구상형의 체세포배가 유도되었다(Fig. 2C). 구상형의 체세포배는 배양이 진행되면서 계속 발달하였으며(Fig. 2D), 자엽과 뿌리가 신장하면서 자엽기로 발달한 후(Fig. 2E), 정상적으로 성장한 것만을 각각 분리하여 MS배지에서 키워 다량의 완전한 소식물체를 얻을 수 있었다(Fig. 2F). 체세포배로부터 발달한 소식물체는 부정아로부터 얻어진 소식물체와 마찬가지로 방법으로 순화시켰을 때 완전한 재분화 개체로 성장하였다.

본 연구에서 확립한 국내 오이 품종의 재분화 시스템은 *Agrobacteria* 및 particle bombardment에 이용하여 외래 유용유전자를 보다 효율적으로 도입하여 형질전환체를 얻는데 이용될 수 있을 것이다.

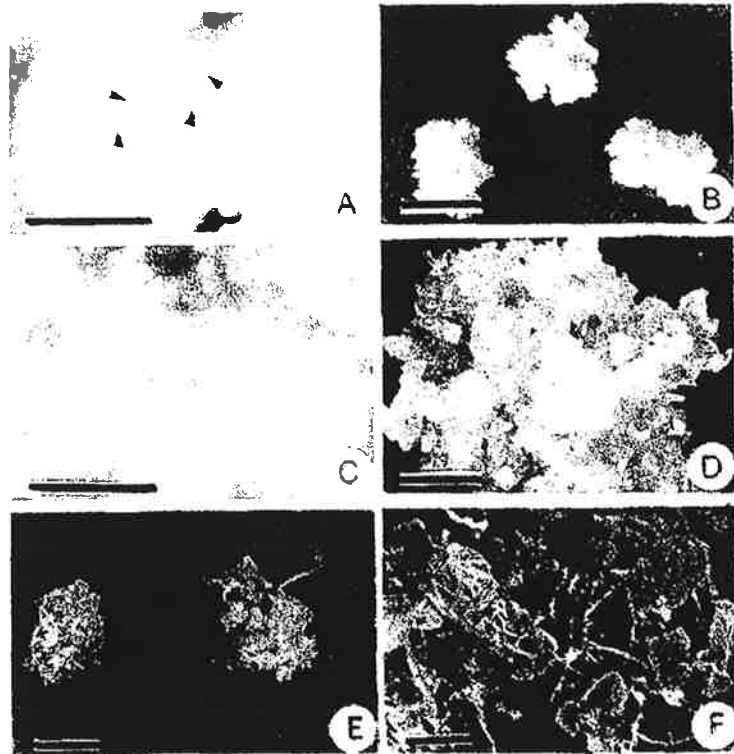


Fig. 2. Somatic embryogenesis from embryogenic callus of cucumber (*Cucumis sativus* L.). A: Embryogenic callus (arrowheads) induced on MS medium containing 1 mg/L 2,4-D. B: Embryogenic callus maintained on MS medium containing 1 mg/L 2,4-D. C: Globular embryos developed on medium without growth regulators. D: Various stage embryos developed from globular embryos. E: Cotyledonary stage embryos developed through somatic embryogenesis. F: Plantlets germinated from mature somatic embryos. Bar = 10 mm.

### 제3절 하배축 배양에 의한 오이의 고빈도 식물체 재분화 시스템 개발

#### 1. 하배축 절단면으로부터 부정아 유도 및 식물체 재분화

오이(*Cucumis sativus* L.) 종자를 생장조절제가 포함되지 않은 MS (Murashige and Skoog, 1962) 배지에서 발아시켰다. 발아 일수별로 유식물체의 하배축을 자엽절에서 2-3 mm의 크기로 절단하여 하배축의 절단면이 배지에 접하도록 배양하였다. 이와 같은 방법으로 하배축 길이(자엽절로부터 2, 3, 4, 6 mm)와 자엽 크기(2 자엽, 1 자엽, 3/4, 1/2, 1/3, 1/10 크기의 두자엽)에 따른 부정아 유도율을 하배축 절단면으로부터 조사하였다. 이들은 1.0-2.0 mg/L zeatin이 함유된 MS 한천배지(0.4% phytigel, pH 5.8)에 옮겨 약  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 형광빛 아래에서 명 16시간, 암 8시간의 광주기로 4주간 배양하였다. 여러 조건에서의 부정아 유도율 조사는 Petridish (87 x 15 mm) 당 5개를 이식하였고, 각각의 조건에서 200-300개의 재료를 사용하여 3회 실시하였다.

배양 4주 후 유식물체의 하배축 절단면에서 유도된 부정아를 절단하여 1.0 mg/L IAA가 첨가된 MS배지에 이식하여 발근시켜 소식물체를 만들었다. 잎이 2-3장 나온 소식물체(크기 약 3-5 cm)는 원예용상토 화분에 옮겨 약 80% 정도의 습도를 유지하면서 순화시켜 완전한 식물체로 키워 과실을 얻었다.

## 2. 고빈도 부정아 유도에 영향을 미치는 요인

### 1) 유식물체 하배축 절단면으로부터 부정아 유도

오이 유식물체의 하배축을 2 mm 정도 남기고 절단한 후 생장조절물질이 첨가되지 않은 MS배지에 절단면이 접하도록 배양하였을 때 대부분의 유식물체의 하배축 절단면에서는 뿌리가 유도되었다(Fig. 3A). 이와 같이 유식물체 하배축의 뿌리쪽을 절단하면 하배축의 절단된 곳에서 뿌리가 발달하는 것은 오옥신 극성 이론에 의해 부정근을 유도하는 것으로 잘 알려져 있다. 그런데, 오이와 같이 대부분의 쌍자엽 식물은 자연적으로 유식물체의 하배축의 어느 부분에서나 뿌리로 분화하는 극성이 있는 것으로 사료된다. 그러나 2.0 mg/L zeatin이 첨가된 MS 배지에 배양하였을 때 하배축 절단면으로부터 부정근이 유도되지 않고 부정아가 유도되는 것이 관찰되었다(Fig. 3B). 이것은 사이토카닌의 외부

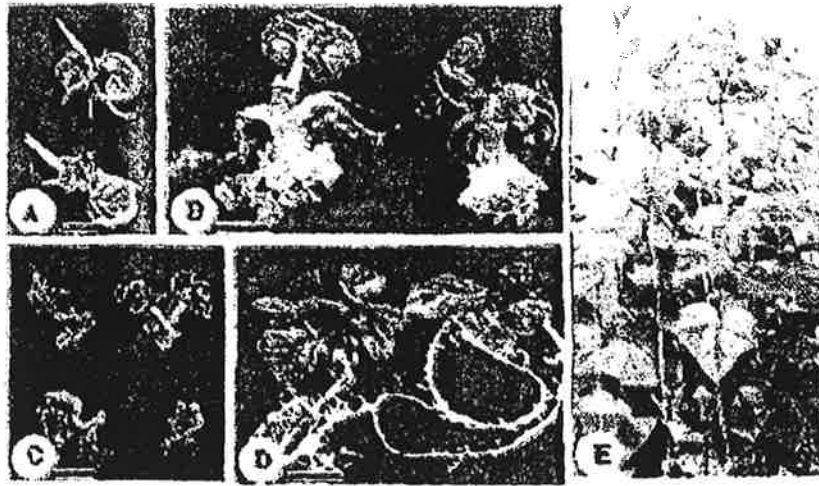


Fig. 3. Shoot induction and regeneration from the excised hypocotyl of cucumber seedlings. A, Roots (arrows) induced from the excised hypocotyl (2 mm in length) for 5 day-old seedlings cultured for 1 weeks on MS medium without growth regulators. B, Shoot (arrows) induced from the excised hypocotyl (4 mm in length) of 5 day-old seedlings cultured for 4 weeks. C, Shoot (arrowheads) excised from the explants. D, Plantlets with roots and leaves. E, Plants regenerated in a greenhouse. Bars = 10 mm.

공급에 의해 배양재료 내부의 호르몬 균형에 변화가 일어나 부정근이 발생되는 대신 부정아가 유도되었다고 여겨지지만, 정확한 이유는 앞으로 구명되어야 할 것이다.

## 2) 하배축 절단면으로부터 부정아 유도시 발아 일수의 영향

유식물체의 종자 발아 일수에 따른 부정아 유도율을 조사하기 위해 하배축을 2 mm 정도 남기고 절단한 유식물체(발아 후 3, 5, 7, 9일째)를 배양하였다. 발아 3일째 유식물체는 자엽을 완전히 제거한 것 이외에 자엽의 절단 크기와 관계 없이 하배축 절단면에서 부정아가 고빈도(약 80-90%)로 유도되었다(Fig.

4). 이것은 Colijn-Hooymans 등(1994)의 3일째 및 5일째의 자엽절편을 배양하였을 때 부정아의 유도가 좋았다는 결과와 비슷하였다. 따라서 발아 3-5일째의 유식물체는 매우 높은 식물체 재분화능을 가지고 있는 것으로 사료된다. 그런데 발아 5일 이후의 유식물체의 경우 두 자엽을 절단하지 않은 것은 부정아 유도율이 급격히 감소되었다(Fig. 4). 반면 한 개의 자엽 또는 1/2로 절단된 두 개의 자엽을 가진 유식물체는 발아 5일째에도 비교적 높은 부정아 유도율을 보였고, 발아 7일 이후부터 부정아 유도율이 떨어졌다. 따라서 유식물체의 하배축 절단면으로부터 고빈도의 부정아를 유도하기 위해서는 발아 3-5일째의 자엽이 절단된 유식물체를 사용하는 것이 적절할 것으로 사료된다.

한편, 오이의 자엽절편만을 배양하였을 때는 유식물체의 어느 발아 일수에서나 부정아 유도율이 최대 20%를 넘지 못했다(Fig. 4). 또한, 자엽이 완전히 절단된 유식물체나 유식물체로부터 하배축만을 절단하여 그 절편만을 배양하였을 때는 캘러스가 유도되고, 부정아는 전혀 유도되지 않았다(자료 미제시). 따라서 본 논문에서 사용한 유식물체의 하배축절단면을 배양하면 기존의 방법보다 훨씬 높은 비율로 부정아를 유도할 수 있을 것이다. 특히, 자엽절편을 배양 재료로 사용하면 부주의에 의해 유식물의 측아가 붙은 자엽 절편을 사용하게 되는 문제점이 있다. 또한, 오이를 포함한 박과 식물의 자엽 절편을 배양하면 여러 겹의 잎만이 유도되어 shoot apex가 발달하지 않고, shoot apex가 있어도 성장이 멈춰 집단 왜소화 현상이 자주 발생한다 (Gambley and Dodd, 1990; Dong and Jia, 1991; Colijn-Hooymans et al., 1994). 그러나 유식물체의 하배축 절단면에서 유도된 부정아는 미분화 및 집단 왜소화 현상이 거의 나타나지 않았다(Fig. 3C).

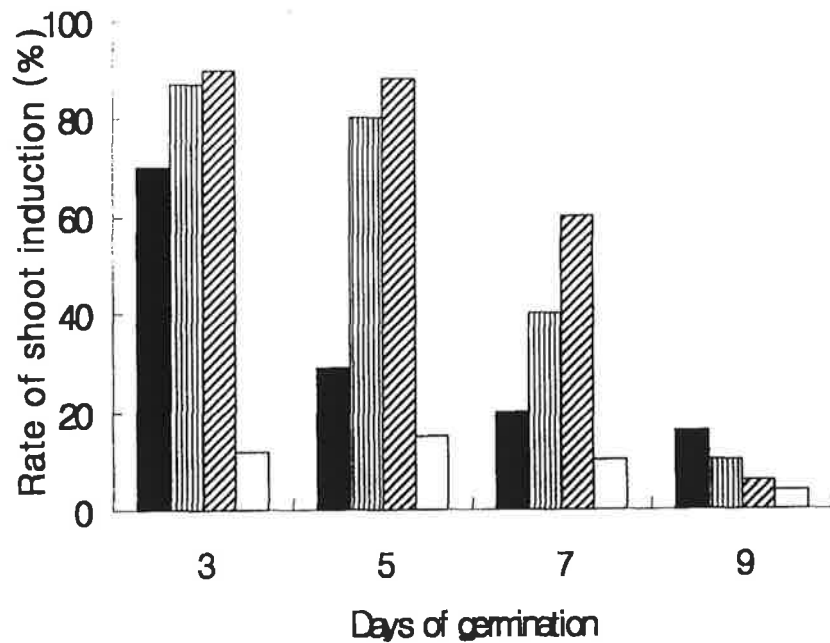


Fig. 4. Rate of shoot induction from the excised hypocotyl (2 mm in length) in germination days of seedlings cultured on MS medium containing 2.0 mg/L zeatin. ■; seedlings with 2 cotyledons. ▨; seedlings with 1 cotyledon. ▩; seedlings with 2 half-cotyledons. □; half-cotyledon.

### 3) 하배축 절단면으로부터 부정아 유도시 하배축 길이의 영향

유식물체의 하배축 절단면으로부터 부정아 유도시 하배축의 길이가 부정아 유도율에 영향을 주는지 알아보기 위해 하배축의 길이를 2, 3, 4, 6 mm로 절단하여 2.0 mg/L zeatin이 첨가된 MS 배지에 배양하였다. 그 결과 하배축의 길이가 길수록 유식물체의 하배축 절단면에서 부정아의 유도율이 낮았다(Fig. 5). 이는 하배축의 윗부분에 가까울수록 부정아 분화능이 높고, 멀수록 낮다는 것을 나타낸다.

자엽이 2개 있는 유식물체의 경우 하배축의 길이가 길수록 부정아 유도율이



현저하게 저하되었고(Fig. 5), 하배축의 길이가 약 6 mm인 경우에는 부정아 대신 부정근이 형성되었다. 이와 같이 하배축이 길면 외래 성장조절물질의 공급에도 불구하고, 유식물체의 절단된 하배축에서 부정근이 유도되는 것은 두가지 측면으로 생각되는데, 먼저 하배축하부 세포는 부정아보다 부정근의 발생능이 높은 것으로 사료되고, 또 하나는 하배축이 긴 배양재료는 내재 호르몬이 원인이 되어 zeatin을 첨가하여도 부정아가 발생하지 않고 부정근이 발생한다고 생각된다.

또한, 자엽의 크기도 부정아 유도에 영향이 있는데, 유식물체의 하배축의 길이가 2 mm 일때(발아 3일째 유식물체)는 두개의 자엽, 한 개의 자엽, 1/2로 절단된 두개의 자엽을 가진 유식물체의 하배축 절단면에서 비슷한 부정아 유도율을 보였지만, 하배축의 길이가 3 mm 이상 일 경우에는 부정아 유도율이 두개의 자엽과 1개의 자엽을 가진 것이 1/2로 절단된 자엽을 2개 가진 것보다 부정아 유도율이 현저하게 감소하였다(Fig. 5). Fig. 2와 3에서 볼 때 자엽이 두개 있는 경우 배양 일수와 하배축의 길이가 길어질 때 자엽 윗부분이 한 개 또는 없는 것에 비해 부정아 유도율이 현저하게 떨어졌다. 자엽 절편만을 배양할 경우에도 자엽 기저부에서 먼 윗부분에서 부정아 유도율이 현저하게 낮았다(Colijn-Hooymans et al., 1994). 이와 같은 결과는 자엽의 윗부분에 부정아 유도에 저해적인 물질이 존재할 수도 있다는 것을 시사한다.

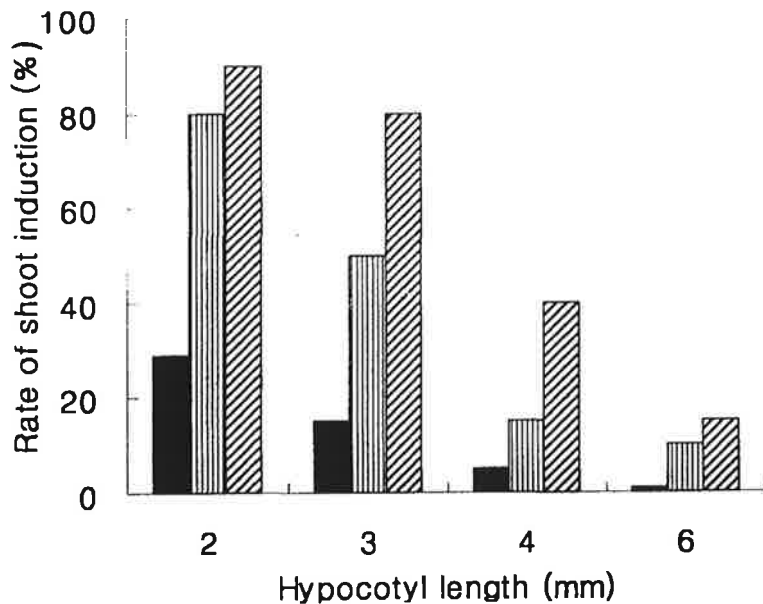


Fig. 5. Effects of various hypocotyl length (2, 3, 4, and 6 mm in length) in shoot induction from the excised hypocotyls of 5 day-old seedlings cultured on MS medium containing 2.0 mg/L zeatin. ■: seedlings with 2 cotyledons. ▨: seedlings with 1 cotyledon. ▩: seedlings with 2 half-cotyledons.

#### 4) 하배축 절단면으로부터 부정아 유도시 자엽 크기의 영향

앞에서 이미 유식물체의 자엽 크기가 하배축 절단면으로부터 부정아 유도에 영향을 있음을 나타내었지만 더 구체적으로 자엽 크기의 영향을 조사하기 위해 하배축(2 mm 크기)이 절단된 유식물체의 1개 자엽은 미리 제거하고, 한 쪽의 자엽을 3/4, 1/2, 1/3, 1/10 정도 남기고 잘라낸 후 zeatin이 1.0 또는 2.0 mg/L 첨가된 MS 배지에서 배양하였다. 그 결과 자엽 크기가 작아질수록 유식물체의 하배축에서 부정아 유도율이 낮아지는 경향을 보였다(Fig. 6). 부정아 유도율이 1/2 자엽 크기 일때를 기점으로 zeatin의 함량이 적은(1.0 mg/L) 배지에서 더 높은 비율로 나타났다. 자엽의 크기가 작아질수록(1/3 자엽 이하)

shoot의 유도율이 현저히 낮아지고 대신 녹색의 callus가 왕성히 유도되었다. 이러한 현상은 자엽의 크기가 너무 작으면 배지의 2.0 mg/L zeatin이 기관분화에 적합하지 않고, 탈분화 되도록 하는 것으로 사료된다. 따라서 본 실험에서 자엽의 크기가 작을수록 부정아 유도율이 작았다는 것은 자엽의 존재가 부정아 유도에 필수적이고, 큰 영향을 미치는 것으로 사료된다.

##### 5) 부정아로부터 식물체 재분화

유식물체의 하배축 절단면에서 유도된 부정아로부터 잎이 1-2장 정도 발달하였을 때 이들을 분리하여 0.3 mg/L NAA 가 첨가된 MS 배지에서 2주간 배양하면 뿌리가 쉽게 유도되었다(Fig. 3D). 부정아의 발달이 늦은 개체는 0.3 mg/L NAA와 0.2 mg/L zeatin이 함께 첨가된 배지에 이식하여 발근시켜 소식물체로 만들었다.

잎이 2-3장 나온 소식물체는 원예용상토의 화분에 옮겨 약 80% 정도의 습도를 유지하면서 순화시킨 후 온실에 정식하여 완전한 식물체로 키워 과실을 얻었다(Fig. 3E). 이와 같이 유식물체의 하배축에서 유도된 부정아는 자엽절편을 배양하였을 때 나타나는 저비율의 재분화 및 여러겹의 잎만이 유도되어 shoot apex가 발달하지 않는 집단왜소화 현상을 현저하게 줄일 수 있다. 따라서 유식물체의 하배축절단면을 배양하여 부정아를 유도하는 방법은 오이 이외에 재분화가 어려운 다른 쌍자엽 식물에서도 적용될 수 있고, 식물체의 상처를 통해 *Agrobacterium*이 감염되어 외래 유전자를 도입시킬 수 있는 형질전환법에 유익하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

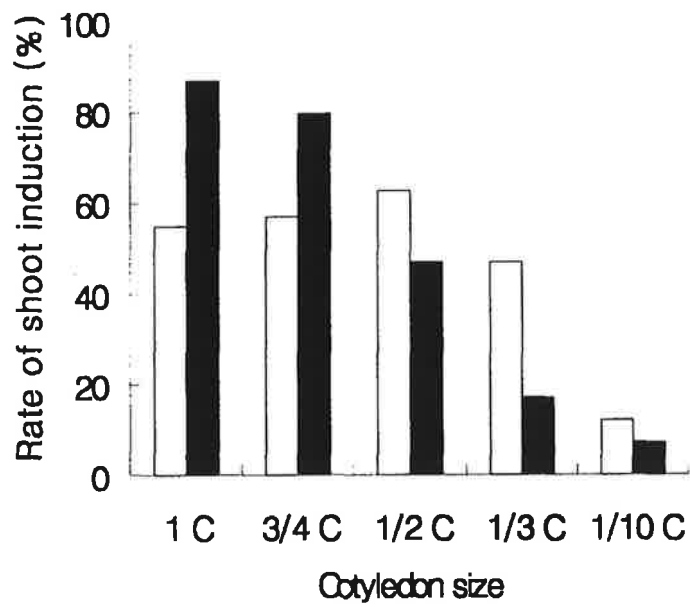


Fig. 6. Effects of various cotyledon size (1, 3/4, 1/2, 1/10) on shoot induction from the excised hypocotyls (2 mm in length) of 5 day-old seedlings cultured on MS medium containing either 0.1 mg/L zeatin (□) or 2.0 mg/L zeatin (■).

## 제 3 장 카사바 배양세포로부터 SOD 유전자 분리

### 제 1 절 서 설

생물이 과다한 스트레스를 받게되면 생체내의 생명의 필수원소인 산소는 생체에 유해한 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)인 superoxide anion radical ( $\cdot O_2^-$ ), hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ), and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) 등으로 변한다. 이러한 ROS에 의한 피해는 산화적 스트레스로 알려져 있으며 이는 환경스트레스의 주 원인이 된다.

Superoxide dismutase (SOD; superoxide:superoxide oxidoreductase, EC1.15.1.1)는 산소가 환원되어 생기는  $\cdot O_2^-$ 를 제거하여  $H_2O_2$ 를 생성하는 효소 ( $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ )로서, 산소를 소비하는 모든 생물종에 존재하여 생체내에서 ROS에 의한 산화스트레스에 대한 일차적인 방어에 관여하는 대표적인 활성산소 저해제이다(Slater, 1984; Cohen, 1988). SOD는 함유하고 있는 metal cofactor에 따라 CuZnSOD, MnSOD, FeSOD의 3종이 있으며 CuZnSOD는 세포질 및 엽록체에, MnSOD는 미토콘드리아에, FeSOD는 엽록체에 존재한다. SOD가 지닌 효소학적 특성을 이용하여 류마티스 관절염 치료 등 각종 퇴행성 질병 치료제 또는 노화방지 화장품의 효소로 개발되고 있다(Foyer and Mullineaux, 1994). 지금까지 분리된 SOD 유전자는 옥수수(Cannon and Scandalios, 1989), 벼(Sakamoto et al., 1992), 고구마(Lin et al., 1993), 고추(Kim et al., 1997) 등 20 여종 이상의 식물체로부터 보고되었으며, 식물체간에 아미노산 수준에서 높은 상동성을 나타내었다.

높은 산화적 스트레스하에서 배양되는 식물배양세포는 여러 가지 항산화효소 생산 뿐만 아니라 스트레스에 대한 기작 연구에 좋은 재료가 될 수 있다. 연구자들은 식물배양세포주의 이러한 점을 이용하여 대표적인 항산화효소 활성을 분석하였으며 그 결과 POD 고생산 세포주로 고구마를 선발하여(Kim et al., 1994) 4 종류의 POD cDNA(Huh et al., 1997; Kim et al., 2000)와 1종류의

genomic DNA를 분리하였으며, 카사바 배양세포주를 SOD 고생산 세포주로 선발하였다(You et al., 1996). 따라서 본 연구에서는 각각의 SOD isoenzym 들의 기능을 분석하기 위하여 카사바 배양세포주로부터 SOD cDNA를 분리하여 산화적 스트레스에 의한 발현특성을 분석하였다.

## 제 2 절 카사바 배양세포로부터 SOD cDNA 분리 및 특성 분석

### 1. 카사바 배양세포주로부터 cDNA library 작성 및 SOD cDNA 분리

카사바배양세포의 Uni-ZAP vector (Staratagene사) cDNA library로부터 전장의 SOD cDNA를 얻기 위하여 스크리닝하였다. 계대배양 20일째의 카사바배양 세포로부터 정제한 mRNA를 주형으로 cDNA를 합성하여 Gigapack III packaging extract를 이용하여  $4 \times 10^5$  pfu의 library를 제작하였으며, 이들을  $2 \times 10^{10}$ /ml로 증폭시킴으로써 카사바 배양세포의 cDNA library를 완성하였다.

카사바 배양세포 cDNA library screening에는 기존에 알려져 있는 여러종류의 식물체 SOD 염기서열에서 상동성이 높은 부분에서 제작된 degenerated primer (SODF1 : 5'-CTTGGNCTTCATGGNTTCCA-3', SODR2 : 5'-CTNCCACCAGC ATTTCCAGT- 3')를 사용하여 합성된 312 bp의 PCR 산물을 pBluescript vector의 EcoR V 위치에 ligation한 후 *E. coli*에 subcloning하였다. 이로부터 plasmid DNA를 분리한 다음 Xba I과 Sal I을 처리하여 약 0.5 kb의 insert를 가진 것을 선발하여 염기서열을 결정한 결과 SOD임이 확인되어 카사바배양세포의 cDNA library 스크리닝을 위한 probe로 이용하였다. 카사바 배양세포 SOD 유전자의 클로닝을 위한 cDNA library 스크리닝은 0.5 kb의 PCR 산물을  $^{32}\text{P}$ -dCTP로 표지하여 수행하였다.  $4 \times 10^6$  phage plaques로부터 두 차례에 걸친 screening 결과 50여 개의 single plaque를 얻어 그중 10개를 선발하여 염기서열을 결정한 결과 한 개의 전장의 CuZnSOD cDNA (mSOD1)를 분리하였다.

## 2. SOD cDNA의 염기서열 분석

카사바 배양세포로부터 분리한 cytosolic CuZnSOD cDNA (mSOD1)은 801 bp로 152개의 아미노산으로 이루어진 ORF (open reading frame)을 가지며, poly(A) tail과 잠정적 polyadenylation signal인 AATAAA를 가지고 있었으며 190 bp upstream에 위치하였다(Fig. 7). 이 아미노산 염기서열을 다른 식물체의 CuZnSOD의 아미노산 염기서열과 비교한 결과 5군데 (MVKAEAVL, PGLHGFHVH, GDTTNGC, DDLGRGGHELS, TGNAGGR)의 염기서열이 잘 보존되어 있었으며 특히 잠정적 Cu binding site로 알려진 HGFHVH가 존재하였다.

여러 식물체의 cytosolic CuZnSOD를 아미노산 수준에서 비교하였을 때 높은 상동성을 보였는데 그중 *Nicotiana plumbaginifolia* (86.6%)와 가장 높았다 (Fig. 8). 또한 mSOD1에는 His-45, His-47, His-62, His-79, Asp-82, 및 His-119 위치에 copper와 zinc 결합부위로 알려진 부위가 잘 보존되어 있었다.







### 3. mSOD1의 발현 및 특성분석

#### 1) SOD cDNA의 Southern blot analysis

카사바 식물체의 잎에서 분리한 염색체 DNA를 *EcoRI*, *HindII*, 및 *HindIII* 등의 제한효소를 처리한 후 mSOD1 cDNA의 3'-untranslated region (230 bp)를 probe로 하여 혼합시킨 결과 서로 다른 크기의 단일 밴드가 확인되었다(Fig. 9). 이로써 카사바의 경우 CuZnSOD 유전자가 한 개씩 존재함을 알 수 있었다.

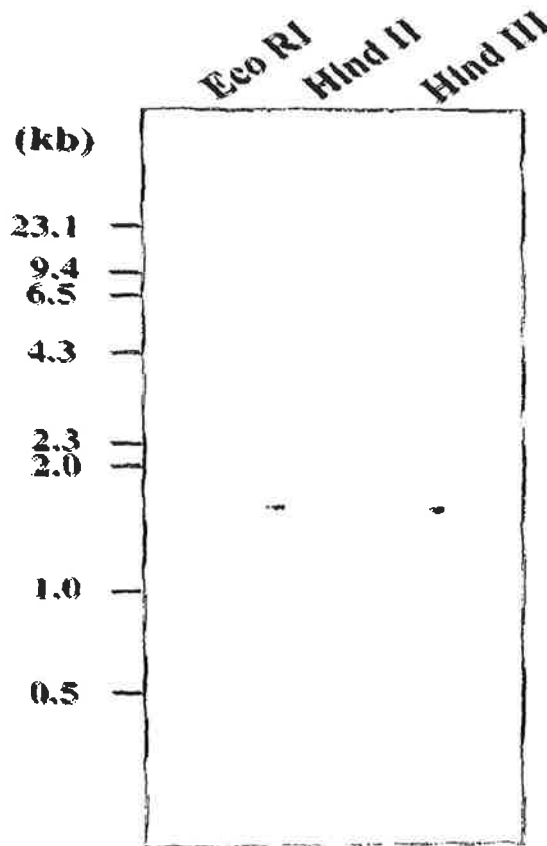


Fig. 9. Southern blot analysis of genomic DNA. Genomic DNA was extracted from the leaves of cassava, digested with *EcoRI*, *HindII*, and *HindIII*, and hybridized with DNA fragment specific to Ca CuZnSOD (230 bp) as probe. Size markers are shown on the left.

## 2) mSOD1의 카사바 배양세포 및 식물체에서의 발현

카사바배양세포와 식물체의 여러조직에서의 mSOD1 유전자의 발현양상을 카사바 배양세포, 식물체의 잎, 엽병, 줄기, 뿌리 및 괴근에서 조사하였다. 각 조직으로부터 RNA를 분리(Naqvi et al. 1998)한 후 0.67 M formaldehyde하에서 1% agarose 겔로 전기영동한 다음 Zeta membrane으로 전이하였다. Northern blot 분석에 사용할 특이적 탐침 (probe)은 mSOD1의 3'-비번역부위 (509-768 bp)를 <sup>32</sup>P로 표지하여 혼성화에 사용하였다.

mSOD1은 배양세포(캘러스)에서 가장 우세적으로 발현하였으며 식물체의 줄기와 괴근에서 강하게 발현하였고 잎과 엽병에서는 약하게 발현하였지만 뿌리에서는 발현되지 않았다(Fig. 10). 한편 괴근에서는 다른 조직에서의 전사체(약 1 kb)와는 달리 약 0.8 kb의 작은 크기의 것이 발현되었는데 이러한 결과는 alternative splicing process에 의해 만들어진 산물이라 생각된다.

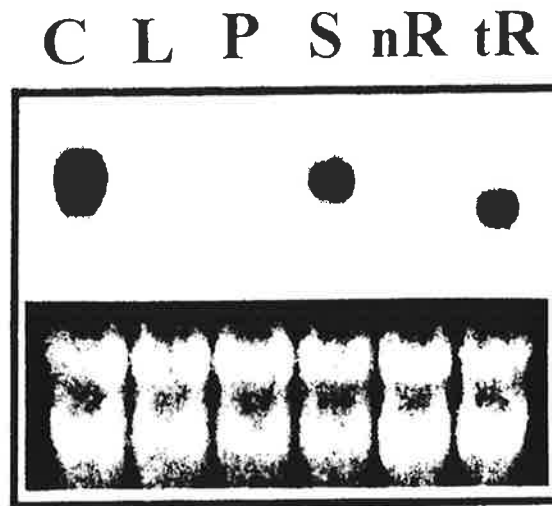


Fig. 10. Expression levels of mSOD1 in cultured cells and various tissues of cassava. RNA was prepared from callus (C), leaf (L), petiole (P), stem (S), nontuberous root (nR), and tuberous root (tR). Equal amounts (40  $\mu$  g) of eand sample were loaded in each lane. An mSOD1-specific DNA fragment was used as a probe. Ethidium bromide stained RNA served as a loading control.

### 3) 배양시기에 따른 mSOD1의 발현양상

카사바 캘러스의 생장은 전형적인 S자형 배양곡선을 나타내었다. 캘러스 생장은 계대배양 후 10일째까지 잠복기를 나타내었으며 이후 세포생장이 급속하게 증가하는 대수증식기를 지나 30일째에 세포생장이 최대치를 보였다. 이때 총 SOD 활성 (units/g dry cell weight)은 대수증식기 말기인 25일째에 낮은 활성을 나타내다가 그 이후부터 40일까지 급격하게 증가하였다(Fig. 11A).

세포생장에 따른 mSOD1의 발현양상은 총 SOD 활성과는 상관관계가 없는 발현양상을 나타냈다. 배양 초기인 계대배양 5일부터 mSOD1이 발현되었으며 대수증식기가 시작되는 10일째에는 약하게 발현하였다. 정지기인 25-30일 사이에는 강한 발현을 하였으나 이후 배양이 진행됨에 따라 아주 약하게 발현하였다(Fig. 11B).

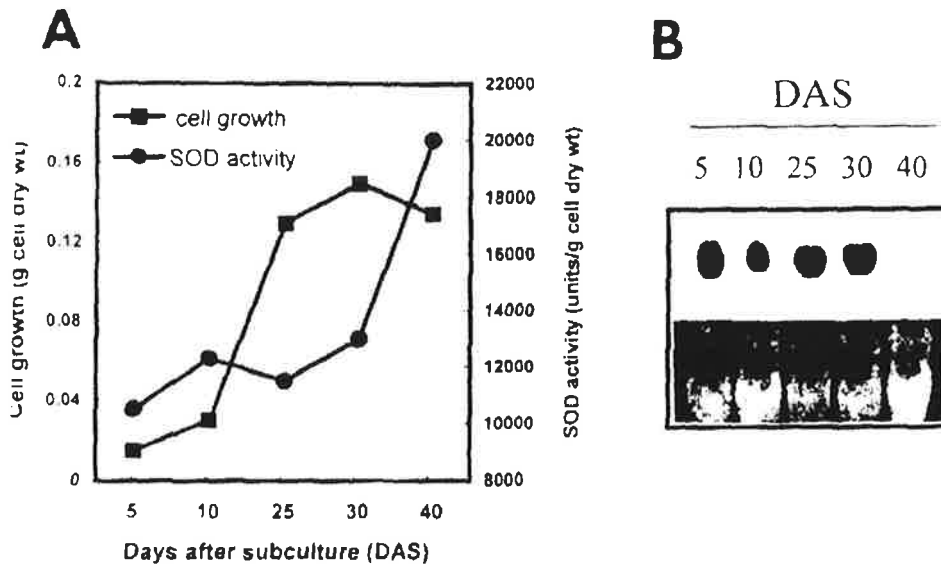


Fig. 11. Changes in SOD activity (A) and mSOD1 transcript accumulation (B) during growth of cassava callus cultures. SOD activity was determined by the McCord and Fridovich method (1969). RNA was extracted at 5, 10, 25, 30, and 40 days after subculture. Equal amounts (40  $\mu$ g) of each sample were loaded in each lane. An mSOD1-specific DNA fragment was used as a probe. Ethidium bromide stained RNA served as a loading control.

#### 4) 온도 스트레스와 mSOD1의 발현

온도 스트레스에 대한 mSOD1 유전자의 발현양상을 카사바 식물체 잎을 대상으로 조사하였다. 식물체의 분열조직으로부터 3번째 잎을 절취하여 증류수가 채워진 50 ml Falcon tube에 잎을 꽂아서 4°C chilling 처리, 37°C heat 처리, 25°C 대조구로 2, 5, 10, 24시간 처리한 후 mSOD1의 발현을 조사하였다. 이때 사용한 탐침은 위에서와 동일한 것을 사용하였다. mSOD1은 chilling과 heat 스트레스에 대해 각기 다른 반응을 나타내었다(Fig. 12).

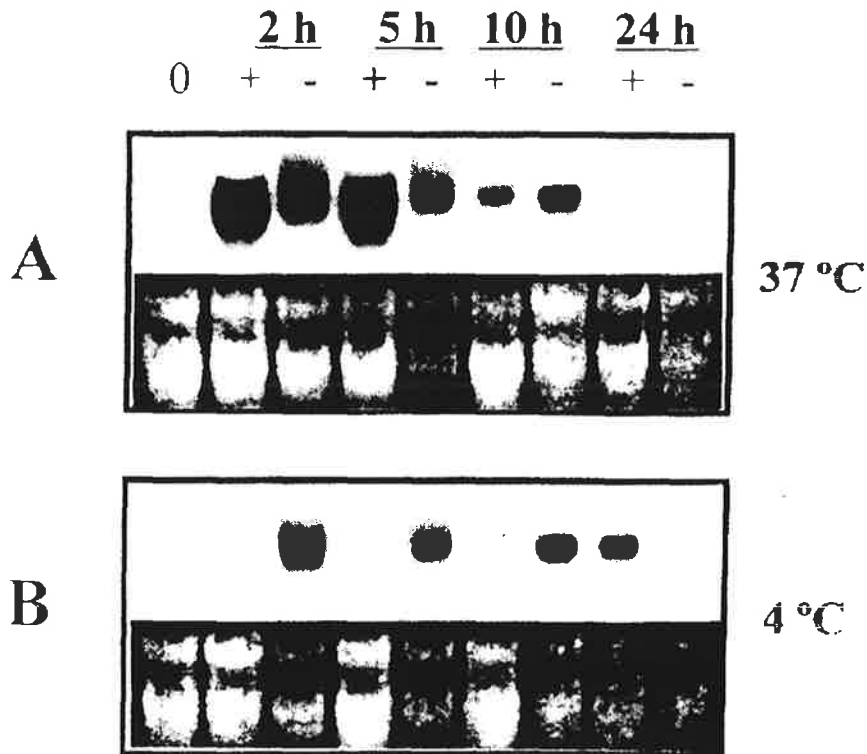


Fig. 12. Changes in *mSOD1* transcript levels in response to heat stress (A) and chilling stress (B) for excised leaves. Total RNA was extracted from leaves at 0, 2, 5, 10, and 24 h after stress treatment. "-" indicates that the samples were incubated at 25°C. Equal amounts (40 µg) of each sample were loaded in each lane. An *mSOD1*-specific DNA fragment was used as a probe. Ethidium bromide stained RNA served as a loading control.

대조구 (25℃)의 경우 2시간째부터 mSOD1의 발현이 시작되어 10시간째까지 일정하게 유지되었다가 24시간째에는 거의 발현되지 않았다. mSOD1은 고온 (37℃) 처리를 하였을 때 2시간째와 5시간째에 강하게 발현하였다가 10시간째에 급격하게 발현이 감소되어 24시간째에는 거의 발현되지 않았다. 그러나 그 반면에 4℃ 저온 (chilling) 스트레스를 처리하였을 때 10시간째까지는 발현되지 않다가 24시간째에 이르러서 발현되었다. 이때 대조구는 24시간 처리시 거의 발현되지 않은 것과는 상반된 결과를 나타내었는데 이것은 저온과 상처 처리의 길항작용에 의한 것이라 생각된다.

#### 5) 스트레스 관련 화합물과 mSOD1 발현

온도 스트레스 처리와 동일한 방법으로 하여 100 mM NaCl, 100  $\mu$ M ABA, 100  $\mu$ M ethephon, 200 mM sucrose 및 물에 25℃에서 24시간 동안 처리하여 mSOD1의 발현을 조사하였다. 모든 처리구에서 물 처리구에서 보다 높은 발현을 보였는데 이중 sucrose 처리구에서 가장 많이 유도되었다(Fig. 13). 이러한 결과는 mSOD1 유전자가 스트레스 관련 화합물 등에 의한 산화적 스트레스에 의해 발현이 유도됨을 시사해 주는 것이라 할 수 있다.

#### 6) Methyl viologen 처리

Methyl viologen은 superoxide radical을 과량으로 발생하여 제초효과를 나타내는 화합물이다. 10 mM의 methyl viologen을 카사바 식물체의 잎에 처리한 다음 1, 6, 30, 54, 78 시간 후에 위에서 3번째 잎을 채취하여 mSOD1의 발현을 조사하였다. 처리 6 시간째부터 발현이 유도되었으며 30 시간째에 가장 강하게 발현되었고 54 시간 후부터 점차 감소하는 경향은 나타내었다(Fig. 14). 가장 높은 발현을 나타낸 30 시간 전후로 해서 식물체의 잎에 반점이 관찰되었다.

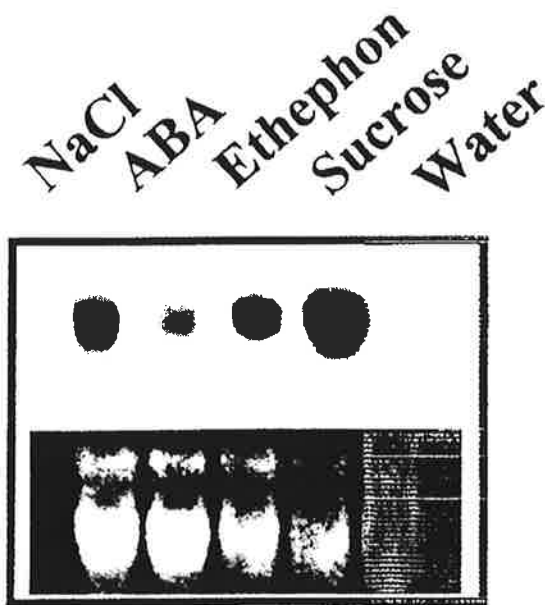


Fig. 13. Transcripts levels of *mSOD1* in response to various chemical stresses. The third leaf from the top was excised and treated for 24 h with 100 mM NaCl, 100  $\mu$ M ABA, 100  $\mu$ M ethephon, and 200 mM sucrose. Equal amounts (40  $\mu$ g) of each sample were loaded in each lane. An *mSOD1*-specific DNA fragment was used as a probe. Ethidium bromide stained RNA served as a loading control.

## HAT

1 6 30 54 78 (h)

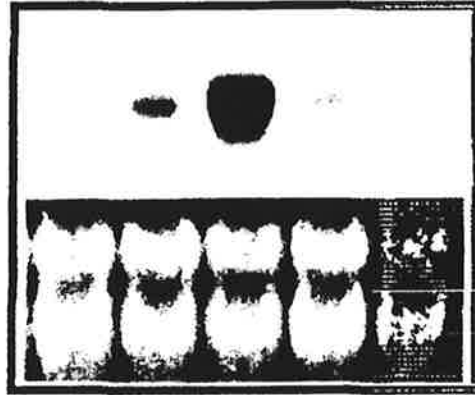


Fig. 14. Northern blot hybridization of total RNAs isolated from methyl viologen treated cassava leaves. Samples were taken at indicated hours after treatment (HAT). Equal amounts ( $40 \mu\text{g}$ ) of each sample were loaded in each lane. An *mSOD1*-specific DNA fragment was used as a probe. Ethidium bromide stained RNA served as a loading control.



## 제 4 장 SOD 고함유 형질전환 오이식물체 개발

### 제1절 서 설

SOD는 산소를 소비하는 식물, 동물, 미생물 등에 존재하며 산소분자가 환원 ( $2O_2 + 2e^- \rightarrow 2 \cdot O_2^-$ )되어 생기는 superoxide anion radical ( $\cdot O_2^-$ )을 제거하는 효소이다(McCord and Fridovich, 1969). SOD 작용에 의해 생성된 과산화수소( $H_2O_2$ )는 peroxidase (POD) 또는 catalase에 의해 독성이 없는 물로 변환된다. Superoxide anion radical과 과산화수소는 철 존재 하에서 가장 독성이 높은 활성산소종인 hydroxyl radical ( $\cdot OH$ )을 생성한다. 따라서 SOD는 superoxide anion radical의 제거와 함께 hydroxyl radical의 생성을 예방하는 역할을 하기 때문에 생체방어기구에 관여하는 중요한 항산화효소이다.

이러한 효소학적 특성을 지닌 SOD는 환경스트레스에 의해 생성되는 생체내 활성산소종을 제거하는 환경내성인자로 중요할뿐만 아니라 의약품, 식품, 화장품 등에 이용될 수 있는 가능성이 제시되고 있다. 특히 SOD는 항염증제로서 관절염, 류마티스, 등에 유효 할뿐 아니라 허혈성 심질환, 방사선 장애방지 등에도 유효성이 인정되어 SOD 관련 의약품 개발이 미국, 일본의 제약회사에서 활발히 진행되고 있다(Bannister et al., 1987). 이미 국내에서도 노화방지용 SOD 함유 화장품이 시판되고 있으나 SOD 활성유지가 어려운 관계로 SOD를 주성분으로 한 화장품은 거의 출시되고 있지 않은 실정이다. 의약품으로서 SOD 개발에 있어 문제점은 체내로의 이동과 생체내에서의 활성을 유지시키는 것이 관건이 되고 있어 제약회사에서는 SOD를 polyethylene glycol, lecithin 등과 결합시켜 생체내로의 이동을 용이하게 하고 생체내에서의 수명연장에 주안점을 두고 있다.

SOD 유전자의 식물형질전환 연구는 주로 제초제(methyl viologen 등), 오존, 저온 등 환경스트레스에 대한 내성기구 해석과 환경내성식물체 개발에 주안점을 두고 많은 연구가 보고되고 있다(Allen, 1995; McKersie et al., 1993;

Perl et al., 1991; Sen Gupta et al., 1993; Van Camp et al., 1994). 그러나 vaccine 유전자를 바나나 등에 도입하여 먹는 백신(edible vaccine)과 같이 SOD를 먹을 수 있는 식물조직에 과량발현하는 식물생체반응기(plant bioreactor) 시스템을 개발하고자 시도된 예는 없다(Goddijin and Pen, 1995; Mason and Arntzen, 1995).

오이(*Cucumis sativus* L.)는 우리 나라에서 재배가 많이 되는 채소작물로서 식품으로서 부가가치가 높을 뿐 아니라 오이를 이용한 맛사지용 팩은 영양분의 공급이나 노폐물 및 각질의 제거, 염증에 대한 진중효과, 미백, 보습 등 여러 가지 효능이 있어 많이 이용되고 있으며, 최근에는 자외선에 피해를 입은 피부에 SOD를 바르면 SOD가 피부의 표피속으로 침투되어 손상된 피부가 회복(보호)된다는 보고도 있다(Filipe et al., 1997). 일반적으로 박과작물의 형질전환은 용이하지 않은 것으로 보고되고 있다. 오이의 형질전환은 농업적으로 유용한 유전자를 도입한 몇 편의 보고가 있다(Chee and Slightom 1991; Raharjo et al., 1996). 오이의 형질전환은 따라서 본 연구는 오이에 SOD 유전자를 과량발현시켜 피부 맛사지용 팩은 물론 신기능성 식품 등으로 이용될 수 있는 SOD 고함유 오이를 개발하고자 하였다.

## 제2절 오이의 형질전환 시스템 확립

### 1. *Agrobacterium*에 의한 오이의 형질전환

발아 7일째의 오이(조생낙함) 자엽절편체를 100  $\mu$ M acetoxyringone을 첨가한 *Agrobacteria* 용액에 10분 동안 침지시킨 후 수분을 제거하고 1 mg/L zeatin과 0.1 mg/L IAA가 함유된 MS배지(MDZI)에 옮겨 4일 동안 공동배양하였다.

오이자엽절편체의 형질전환에 사용한 plasmid Bin19 binary 벡터는 완두(*Pisum sativum*)의 MnSOD cDNA와 kanamycin 저항성 유전자(neomycin

phosphotransferase, nptII)를 cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter에 연결되어 *A. tumefaciens*에 들어있으며(Fig. 15) Dr. Allen (Texas Tech University)으로부터 분양 받은 것이다. *Agrobacterium*과 4일간 공동배양한 자엽절편을 MS 선발배지에서 약 15일간 배양하였을 때 kanamycin 저항성을 지닌 shoot이 유도되었다(Fig. 16A). 자엽절편을 1주 간격으로 동일 선발배지에서 계대배양하여 형질전환된 shoot를 다시 선발하였다. 선발배지에서 6주간 배양하였을 때 약 4%(20개체)의 shoot이 자엽에서 유도되었다. 이 비율은 *Agrobacterium*에 감염시키지 않은 자엽절편으로부터 shoot 유도율(11-12%)과 비교하였을 때 현저하게 낮은 빈도였다. 배양 6주 후 kanamycin 저항성을 가진 shoot만을 절단하여 발근배지에 옮겨 뿌리를 유도하였다(Fig. 16B). 잎의 수가 3-4장 되는 소식물체를 화분에 옮겨 순화시켜 비닐하우스에서 생육시켰을 때, 형질전환 식물체와 비형질전환 식물체는 정상적으로 개화하였으며 식물의 형태적인 차이는 없었다(Fig. 16C).

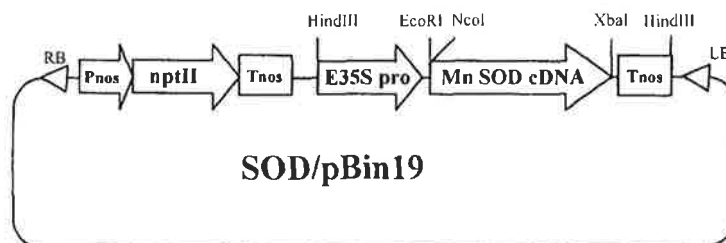


Fig. 15. A partial map of the plant expression vector, E35S pro-SOD/pBIN19 harboring E35S promoter, MnSOD cDNA, and nptII gene. A Mn SOD cDNA is mitochondrial Mn SOD isolated from pea. E35S pro: enhanced CaMV 35S promoter; Tnos: nopaline synthase terminator sequence.

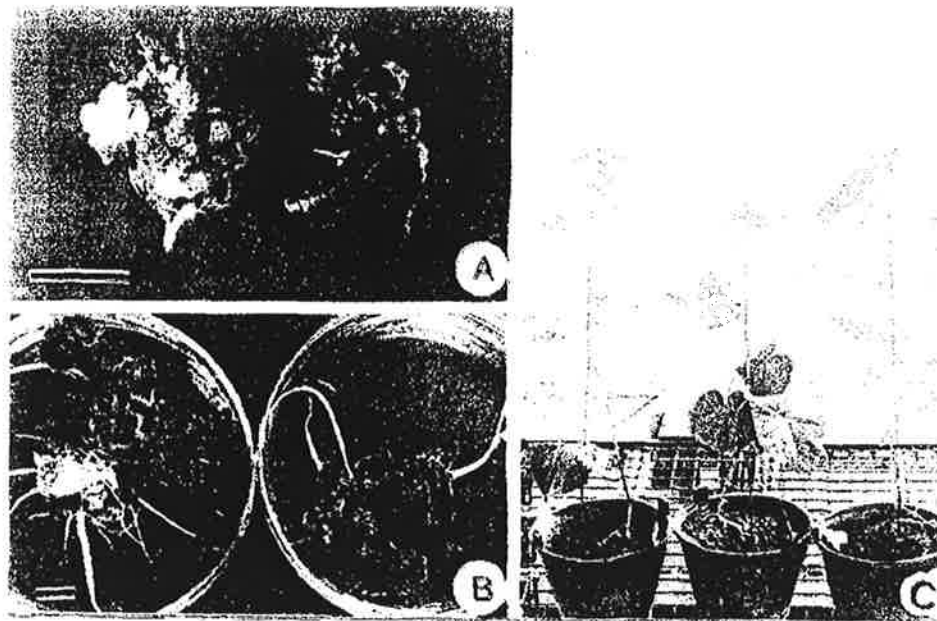


Fig. 16. Plant regeneration by organogenesis from cotyledon cultures of cucumber (*Cucumis sativus* L.) co-cultured with *Agrobacterium*. A, Shoots induced from cotyledons on selection medium. B, Kanamycin resistant-plantlets growing on the selection medium. C, Transformed plants developing in the green house. Bars indicate 10 mm.

## 2. SOD 유전자의 확인 및 발현

SOD 유전자의 식물체로의 도입확인 은 kanamycin 선발배지에서 선발된 소식물체 앞의 genomic DNA내에서 nptII 유전자의 존재여부를 PCR로 분석하였다. Kanamycin에서 선발된 소식물체의 잎조직으로부터 염색체 DNA를 분리한 후 nptII 유전자의 특이-primer를 사용하여 PCR를 수행하였다. Sense primer (5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3')와 antisense primer (5'-ATGGGGAGCGCGGATACCGT A-3')를 이용하여 94°C에서 5분 동안 변성시키고, 94°C에서 1분간 변성, 65°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분 동안 extension 시키는 순서로 30회 동안 반복하여 DNA 파편을 증폭시켰다. Fig. 17은 선발된 소식물체중 9개체의 PCR

분석결과를 나타낸 것으로 3개체(No. 1, 2, 3)에서 PCR산물로 0.7 kb의 DNA band가 관찰되었다. 이것은 kanamycin 선발배지에서 재분화된 소식물체 중 일부에서 선발표지인 nptII 유전자가 식물체 염색체 DNA로 삽입되었음을 알 수 있었다.

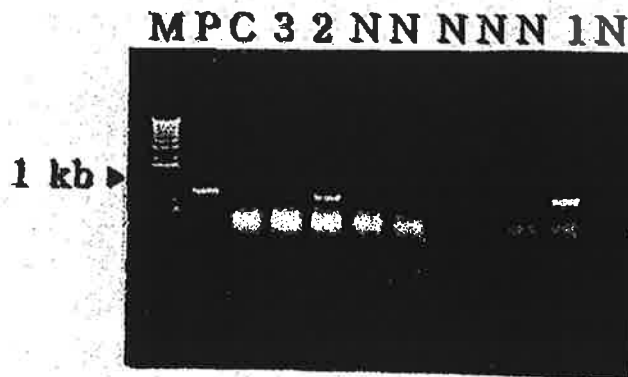


Fig. 17. Conformation of regenerated plants by PCR using NPTII gene primers and genomic DNAs from transformed and non-transformed control plantlets. Lane M: marker DNAs. Lane P: pBin19 vector plasmid DNA as positive control. Lane C: non-transformed control plant DNA. Lanes 1-3: Transformed plant DNA showed PCR positive response. Lane N: PCR negative plantlets.

PCR 분석에 사용한 모든 소식물체를 비닐하우스에서 순화시킨 후 성장한 식물체의 과실에 함유되어 있는 SOD 활성을 측정하였다. 오이 과실의 SOD 활성은 xanthine oxidase (XOD)와 cytochrome c를 이용한 McCord와 Fridovich (1969)의 방법에 따라 xanthine, xanthine oxidase (XOD)와 cytochrome c를 이용하여 측정하였다. 효소측정을 위한 반응액[10 mM xanthine 2.5 mL, 10 mM cytochrome c 0.5 mL, 0.1 mM EDTA를 포함한 0.05 M 인산완충액(pH 7.8) 47 mL

의 혼합액]은 매번 조제하여 사용하였다. 반응액중 cytochrome c의 농도를 일정하게 유지하기 위하여 반응액을 만든 후 sodium dithionite로 매회 보정하였다. 상기 반응액 1 mL과 효소액(10  $\mu$ L 전후)을 큐벳에 넣은 후  $10^{-4}$  M EDTA를 포함한 0.05 M 인산완충액(pH 7.8)으로 25배 희석한 XOD 10  $\mu$ L를 첨가하여 효소반응을 시작하였다. 효소활성의 1 단위(unit)는 25 $^{\circ}$ C에서 2분간 반응하여 550 nm에서 흡광도변화를 조사하여 XOD 활성이 50% 억제된 것으로 정의하였다.

그 결과 PCR에서 양성반응을 나타낸 형질전환체로 추정되는 개체에 비해 SOD의 함량이 *Agrobacterium*에 감염시키지 않고 재분화시킨 개체(대조식물체)에 비해 높았다(Fig. 18). 특히 형질전환 개체중 1개(No. 1)는 대조식물체에 비해 약 3.2배의 SOD 활성을 나타내었다. SOD와 같은 항산화효소인 peroxidase (POD)의 경우는 형질전환체와 대조식물체 모두 비슷한 활성을 나타냈다.

형질전환 오이의 열매의 SOD isoenzyme 패턴 (활성)을 native gel 방법으로 조사하였다(Fig. 19). SOD native gel 전기영동은 Beauchamp와 Fridovich(1971)의 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 약 2 g의 열매조각을 0.05 M 인산 완충액 (pH 7.0) 0.5 mL과 함께 얼음위의 막자사발에서 마쇄한 후 14,000 rpm로 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 조효액으로 사용하였다. 단백질정량은 Bradford (1976, BioRad사)의 방법에 따라 측정하였다. 조효액의 단백질농도가 동일량이 되도록 조정하여 9.8% polyacrylamide gel에 80 V로 5시간 전개시켰다. SOD의 검출은 gel을 염색액(50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 mM EDTA, 0.2% TEMED, 0.026 mM riboflavin, 0.25 mM nitro blue tetrazolium의 혼합액)에 30분간 넣고 암상태에서 진탕한 후 빛을 조사하면서 10분간 반응시켰다.

그 결과 형질전환체의 과실은 대조식물체에 비해 진한 MnSOD isoenzyme 밴드를 나타내어 완두 MnSOD 유전자가 오이과실에 정확하게 발현되었음을 확인하였다(Fig. 19). 오이 과실의 SOD 활성(약 74 units/mg protein)은 식물배양세포의 활성보다 매우 낮은 것으로 나타나 유전자의 발

현기구를 잘 조절하면 오이 과실내에 SOD함량을 내생 SOD 함량보다 수배 또는 그 이상으로 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다. SOD를 고생산하는 카사바와 토마토 배양세포의 활성은 오이 과실의 함량보다 20-40배 높았다.

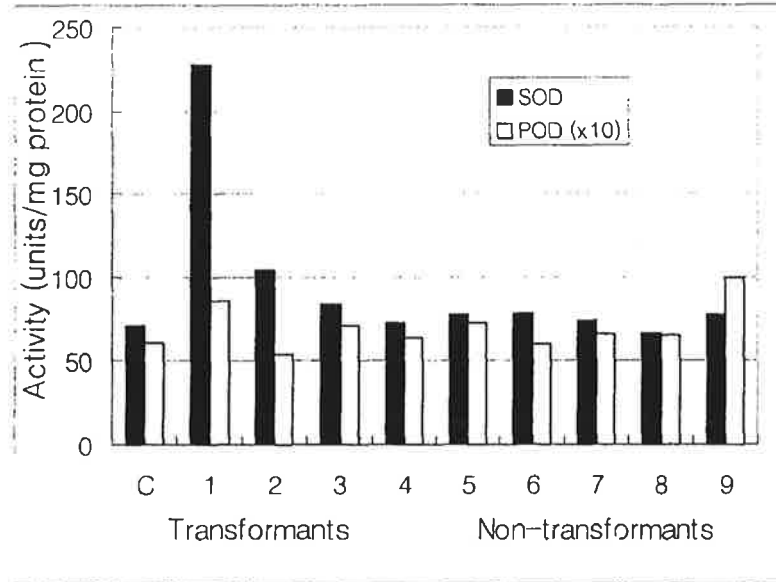


Fig. 18. SOD and POD activities in fruits of transformed and non-transformed control plants regenerated from cotyledon cultures. C, non-transformed control plant; 1-3, PCR positive transformed plants. 4-9, PCR negative-responded plants.

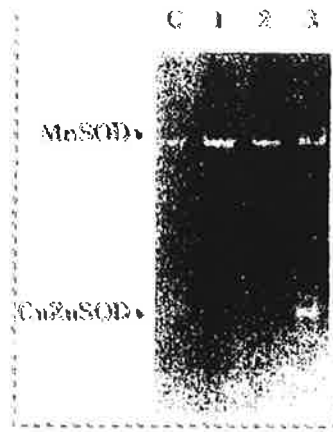


Fig. 19. Native gel stained for the SOD activity from the fruits of transformed and non-transformed cucumber plants. Equal amount of total protein (40  $\mu$ g) was loaded to each lane. Lane C, non-transformed plant. Lanes 1-3, transformed plants.

### 제 3 절 SOD 고함유 형질전환 오이식물체 개발

#### 1. 과실우세발현 ASO promoter를 이용한 SOD 형질전환 벡터제작

카사바 배양세포에서 분리한 cytosolic CuZnSOD, 즉 mSOD1을 오이 과실에서 우세적으로 발현시키기 위한 형질전환용 벡터를 제작하기 위하여 먼저 일본 NAIST에서 분양받은 오이의 과실우세발현 promoter인 ascorbate oxidase (ASO)의 promoter(Yoshida et al., 1994)를 *HindIII*와 *EcoRI*의 제한효소서열을 가지고 있는 primer를 이용하여 PCR로 증폭시킨 후, 이 PCR 산물 (약 1.1 kb)을 *HindIII*와 *EcoRI*으로 절단하여 pBluescript KS 벡터의 *HindIII*-*EcoRI*의 위치에 삽입하였다(ASOp/pBluescript). 그 다음에 *PstI*와 *BamHI*의 제한효소서열을 가진 primer로부터 합성한 mSOD1 PCR 산물을 pBluescript KS 벡터의 *PstI*-*BamHI*의 사이에 삽입시켰다(ASOp+mSOD1/ pBluescript). ASOp+mSOD1을 식물형질전환용 벡터인 pBI101에 도입하기 위하여 이들 plasmid DNA를 *HindIII*와 *BamHI*으로 절단한 다음 *BamHI* 자리를 blunt end로 만들었다. *HindIII*-*BamHI* fragment를



binary 벡터인 pBI101에 삽입시키기 위하여 먼저 pBI101를 *Hind*III와 *Sac*I으로 자른 후 *Sac*I부위를 blunt end로 만들고 그 사이에 *Hind*III-*Bam*HI fragment를 삽입시켰다 (ASOp+mSOD1/pBI101). 마지막으로 ASOp+mSOD1/pBI101의 선발표식인자를 *npt*II에서 *bar*로 전환하기 위하여 binary 벡터인 pGPTV-*Bar*를 사용하였다. 위의 ASOp+mSOD1/pBI101를 *Hind*III로 절단하고 *Eco*RI으로 부분절단 (partial digestion)하여 얻은 약 2 kb 단편을 pGPTV-*Bar*의 *Hind*III/*Eco*RI 위치에 삽입하여 벡터 ASOp+mSOD1/pGPTV-*Bar* (Fig. 20)를 완성하였다. 이 재조합 DNA를 변형된 An (1987)의 방법으로 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 도입시켜서 오이식물체의 형질전환에 이용하였다.

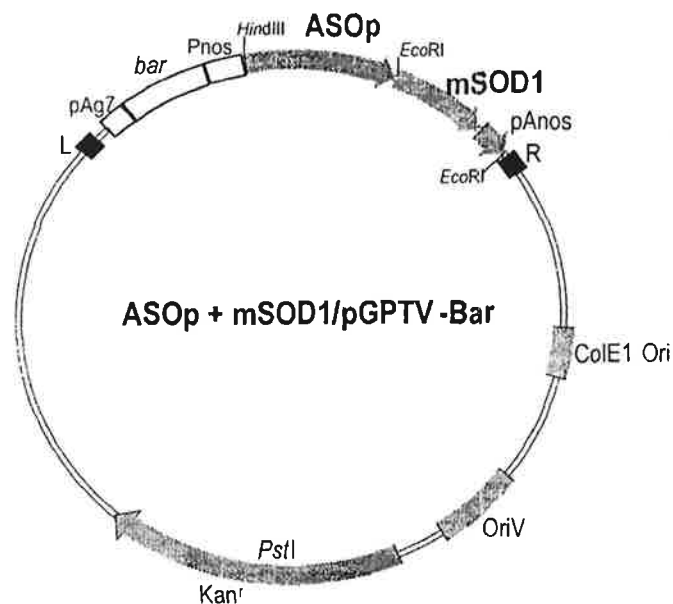


Fig. 20. Cucumber transformation vector. A binary vector pGPTV-*Bar* harboring ascorbate oxidase (ASO) promoter, cassava mSOD1, and *bar* gene as a selectable marker.

## 2. SOD 형질전환 오이 개발 및 분석

### 1) 형질전환 오이식물체 개발

해동백다다기 종자를 1% sodium hypochloride 용액으로 표면살균 한 후 생장조절제가 첨가되지 않은 MS 배지에서 광 발아시킨 발아 5일 된 유식물체의 자엽절편체를 형질전환에 사용하였다.

ASOp+mSOD1/pGPTV-Bar를 가진 *Agrobacteria*를 AB배지 (3 g/L  $K_2HPO_4$ , 4 g/L  $NaH_2PO_4$ , 4 g/L  $NH_4Cl$ , 600 mg/L  $KCl$ , 1.2 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 50 mg/L  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 10 mg/L  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 5 g/L glucose)에서 3일동안 배양하여 얻은 pellet을 AAM (MS salt + 20 mg/L acetosyringone, pH 5.2)배지에 현탁시켜서 식물재료(하배축절단면, 자엽절편체)와 30분 정도 접촉시킨 다음 2Z+ASB 배지 (MS salt + 2 mg/L zeatin, 10 g/L glucose, 100 mM acetosyringon, 1 mM betain, pH 5.2)에서 3일 동안 공동배양하였다. 공동배양 후 박테리아를 제거한 다음 2 mg/L zeatin과 2 mg/L Basta, 300 mg/L claforan이 첨가된 MS 배지에서 배양하였다. 배양 3-4주에 Basta-저항성을 지닌 shoot이 유도되었으며 유도된 shoot를 1 mg/L IAA, 2 mg/L Basta, 300 mg/L claforan이 첨가된 MS 배지에서 뿌리를 유도하고 순화과정을 거친 후 온실에서 성숙한 개체로 발달시켜 꽃과 열매를 얻었다(Fig. 21).

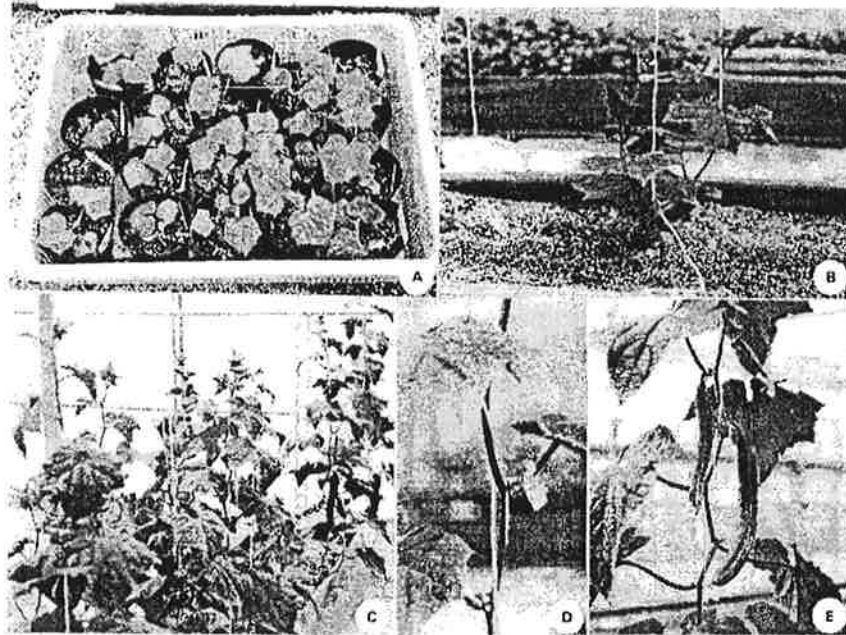


Fig. 21. Plants regeneration through shoot induction from cotyledon explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings co-cultured with *Agrobacteria*. A, Acclimatized plantlets with roots and leaves. B, Plants regenerated in a green house. C, Regenerated plants with flowers and fruits in the green house.

## 2) 형질전환 오이의 선발

최종적으로 뿌리까지 유도되어 기내에서 자라고 있는 식물체의 잎이 3-4개 자랐을 때 잎으로부터 염색체 DNA를 분리한 다음 bar 유전자 특이 primer를 사용하여 PCR를 수행하였다. PCR의 annealing은 57°C에서 1분 동안 실시하였으며 bar 유전자의 5'-GGTCTGCACCATCGTCAACC-3'(sense)와 5'-TCAGATCTCGGTGACGGCA-3'(antisense)를 primer로 이용하였다. 그 결과 Basta에 배지에서 선발된 재분화 식물체의 60%가 0.5 kb의 밴드를 합성하였다(결과 미제시). PCR 결과 양성반응을 나타낸 재분화 개체뿐만 아니라 음성반응을 나타낸 개체를 위탁기관

(충청남도농업기술원)에 재배를 의뢰한 결과 순화를 거쳐 살아남은 개체를 온실에서 재배하면서 특성조사 및 교잡실험을 하였다.

기내에서 PCR 양성반응을 나타낸 소식물체가 포장에서 순화과정을 거쳐 성숙한 식물체로 성장하여 꽃이 피고 열매를 맺을 수 있을 시기에 2차 PCR을 수행하였다. ASO 프로모터 및 mSOD1 유전자 특이 primer을 사용한 결과 대부분의 식물체는 PCR 음성반응을 보였다(결과 미제시). mSOD1의 경우 5'-GATAGAGTGCTTCTCCAGAGATC-3'(sense)와 5'-GCGCGGATCCAACATCCACGGCCTG-3'(antisense)를, ASO 프로모터 primer는 5'-GCGCAATCTTCTAAATATTCTCTTTTAATTG-3'(sense)와 5'-GCGCGAATTCTTGAAGGGTTGAG-3'(antisense)를 primer로 사용하였다. 어린 단계의 재분화 식물체의 PCR 결과가 성숙한 개체의 것과 다른 이유는 기내에서 자라는 식물체의 경우 *Agrobacteria* 오염이거나 또는 분열조직으로부터 유도된 shoot이 chimera인 이유로 PCR시 일관성없는 결과가 얻어지는 경우라 생각된다. 성숙한 오이식물체로부터 mSOD1 cDNA 및 ASO promoter 부위의 특이 primer를 이용하여 PCR를 수행한 결과 4개체에서 0.26 kb 및 1.1 kb의 밴드가 각각 합성되었다(Fig. 22). PCR로 형질전환이 확인된 4개체 (1번, 2번, 4번, 5번)은 포장에서 선발할 당시 2-1, 2-1, 15, 32번으로 번호가 매겨진 식물체이었으며 앞으로 이들 식물체를 T1, T2, T3, 및 T4 식물체로 각각 명명하여 Southern, northern, SOD 활성 등을 분석하였다.

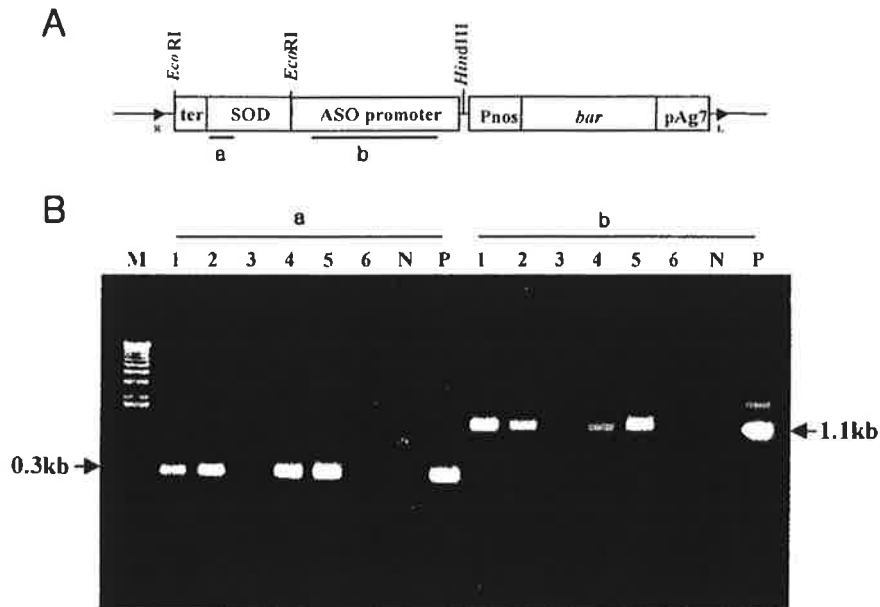


Fig. 22. Detection of mSOD (a) and ASO promoter (b) genes in transgenic cucumber plants by PCR. M: 1 kb ladder. 1-6: Basta-resistant regenerants genomic DNA. P: pGPTV-Bar plasmid DNA as a positive control. n: no DNA as a template. The 0.26 kb and 1.1 kb fragments were synthesised by PCR using gene specific primers, respectively. A, Partial map of ASOp+mSOD1/pGPTV-Bar vector. B, PCR products of transgenic cucumber plants. Bars indicate the position of primer for PCR.

### 3) 형질전환 오이식물체의 Southern 분석

Basta 함유배지에 선발되어 PCR로 확인이 된 오이식물체 4개체를 대상으로 Southern분석을 실시하였다. 온실에서 생육중인 오이식물체의 잎으로부터 genomic DNA를 분리한 다음 *EcoRI* 및 *HindIII*로 절단하여 0.8% agarose gel에 전기영동하고 Zeta Probe membrane(Bio-Rad 제품)으로 전이하였다. 도입 유전자인 카사바 mSOD1 cDNA의 3'-UTR 부위 (특히 유전자 부위)를 PCR로 합성 (260

bp)하여 probe로 이용하였다. 60°C에서 24시간 동안 hybridization한 다음 membrane을 세척하고 X-ray 필름에 노출하여 밴드를 확인하였다. 그 결과 3개체는 한 copy씩, 3번 식물체는 2 copy가 도입되었음을 알 수 있었다(Fig. 23).

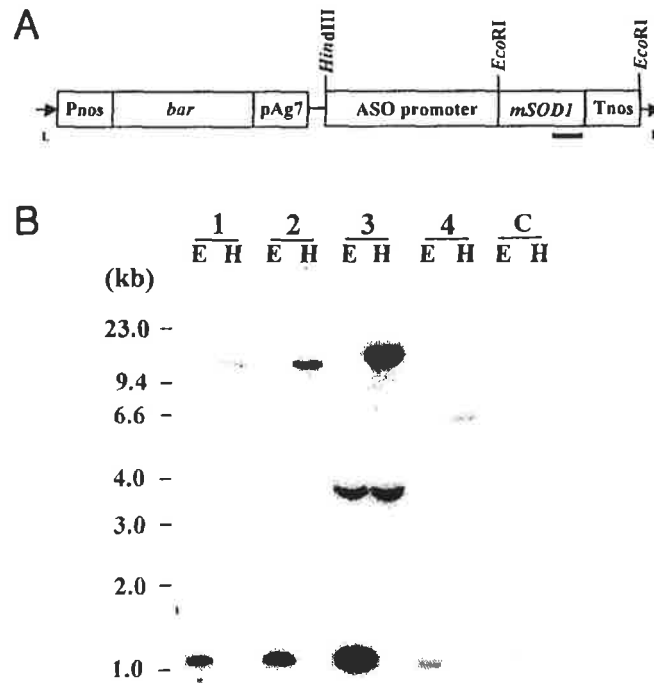


Fig. 23. Southern analysis of genomic DNA prepared from cucumber leaves. Equal amounts (50  $\mu$ g) of genomic DNA were digested with the restriction enzymes, electrophoresed in 0.8% agarose gel. The blot was hybridized with the 230 bp fragment of mSOD1 cDNA as a specific probe. The positions of molecular weight markers are shown on the left. 1-4: PCR-positive regenerants. C: non-transformed plant. E: *EcoRI*, H: *HindIII*.

#### 4) 형질전환 오이의 northern분석

PCR 및 Southern 분석으로 SOD 형질전환체가 확인된 4 개체 식물체 및 대조구 식물체의 열매와 잎을 채취하여 액체질소로 얼려서 RNA를 분리하기 전까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 형질전환 T4 식물체의 경우 열매 시료를 채취할 당시 실험 재료로 사용할 만큼 건전한 잎이 존재하지 않아서 실험에서 제외되었다. Total RNA는 LiCl를 이용하여 분리하였으며  $50\ \mu\text{g}$  RNA를 5.1% formaldehyde가 함유된 agarose gel에서 전기영동한 다음에 Zeta GT membrane (BioRad)으로 옮겼다. 혼성화 반응에 사용한 probe는 Southern 분석시와 같은 것으로 Random Primed DNA labeling Kit (Boehringer Mannheim)를 이용하여  $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ 로 표지하였으며  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 동안 반응시켰다.

SOD 형질전환 오이식물체에서 mSOD1 유전자는 열매에서 강하게 발현하였으나 잎에서는 거의 발현되지 않거나 약하게 발현하였다(Fig. 24). 이것은 사용한 ASO 프로모터가 오이의 열매 혹은 줄기에서 강하게 발현하지만(Yoshida et al. 1994) 잎에서는 아주 약하게 발현하는 특징을 가지고 있는데 형질전환 오이의 경우 사용한 프로모터가 제대로 발현되었음을 반영한 결과라 할 수 있다.

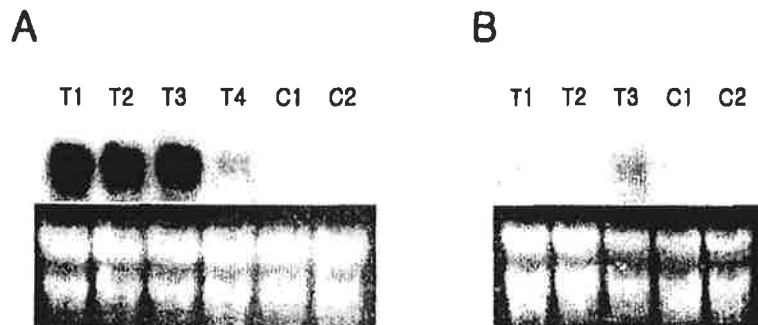


Fig. 24. Expression levels of mSOD1 in transgenic cucumber plants. Total RNA was extracted from fruits (A) and leaves (B) in cucumber plants. Equal amounts ( $50\ \mu\text{g}$ ) of each sample were loaded in each lane. An mSOD1-specific DNA fragment(230 bp) was used as a probe. Ethidium bromide-stained RNA served as a loading control. T1-T4: transgenic plants. C1-C2: non-transgenic plants.

### 5) 형질전환 오이의 SOD 활성 분석

핵산분석 결과 형질전환이 확인된 오이(해동 백다다기)의 열매를 0.05 M 인산완충액(pH 7.0)과 함께 액체질소를 이용하여 막자사발에서 마쇄한 후 원심 분리한 다음 상등액을 조효소액으로 이용하였다. SOD 활성은 xanthine oxidase (XOD)와 cytochrome c를 이용한 McCord와 Fridovich (1969) 방법에 따라 측정하였다. 효소활성 측정을 위한 반응액(cytochrome c 포함)을 실험시 새로이 조제하였으며 반응액 1 mL과 효소액 10  $\mu$ L을 큐벳에 넣은 후 효소반응 측정을 수행하였다. 효소활성의 1단위(unit)는 25°C에서 반응을 시작하여 2분간 550 nm에서 흡광도 변화를 조사하여 XOD 활성이 50% 억제된 것으로 정의하였다.

형질전환 오이 열매의 SOD 비활성도(unit/mg protein)는 140-160 정도로 비형질전환 오이열매(60 units/protein)의 것에 비해 약 2.5배 높았다(Fig. 25A). 형질전환 식물체의 열매에서 전체 SOD 활성도 비형질전환 오이열매보다 3배 이상 높게 나타났다. 하지만 잎의 SOD 활성은 형질전환에 관계없이 일정하게 유지되었다(Fig. 25B). Northern 분석에서와 마찬가지로 T4 식물체의 경우 시료로 적당한 상태의 잎이 없어서 실험에서 제외되었다.

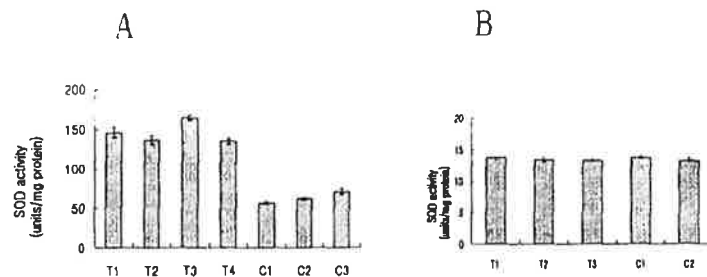


Fig. 25. SOD specific activity (units/mg protein) in fruits (A) and leaves (B) of transgenic and non-transgenic cucumber plants. T1-T4: Transgenic cucumber plants. C1-C3: Non-transgenic cucumber plants.



형질전환 오이의 열매의 SOD isoenzyme 패턴 (활성)을 native gel 방법으로 조사하였다. SOD native gel 전기영동은 Beauchamp와 Fridovich(1971)의 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 약 2 g의 열매조각을 0.05 M 인산 완충액 (pH 7.0) 0.5 mL과 함께 얼음위의 막자사발에서 마쇄한 후 14,000 rpm로 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 조효액으로 사용하였다. 단백질정량은 Bradford (1976)의 방법에 따라 측정하였다(BioRad). 조효소액의 단백질농도가 동일량이 되도록 조정하여 9.8% polyacrylamide gel에 80 V로 5시간 전개시켰다. SOD의 검출은 gel을 염색액(50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 mM EDTA, 0.2% TEMED, 0.026 mM riboflavin, 0.25 mM nitro blue tetrazolium의 혼합액)에 30분간 넣고 암상태에서 진탕한 후 빛을 조사하면서 10분간 반응시켰다. 비교구로 이용한 카사바 캘러스의 경우 1개의 MnSOD, 2개의 FeSOD, 3개의 CuZnSOD, 모두 6개의 SOD isoenzyme이 관찰되었다. 대조구 오이의 경우에는 1개의 MnSOD와 3개의 CuZnSOD isoenzyme이 관찰되었으나 FeSOD는 존재하지 않았다. 형질전환 오이 열매의 경우 형질전환시키지 않은 대조구의 오이 열매에서는 관찰되지 않은 새로이 발견되는 한 개의 CuZnSOD isoenzyme 밴드와 대조구에 없는 2개의 CuZnSOD, 모두 7개의 SOD isoenzyme이 존재하였다(Fig. 26A). 이와같이 도입한 유전자 이외에 대조구에는 존재하지 않은 다른 SOD isoenzyme이 추가로 존재하는 이유는 SOD가 dimer로 존재하여 서로 반응한 결과라 추정된다. 이러한 결과는 APX를 도입한 형질전환식물체에서 발견되는 현상이다(Allen의 미발표 결과). 그러나 잎의 SOD isoenzyme은 열매의 경우와는 다른 SOD isoenzyme 패턴으로 1개의 MnSOD와 4개의 CuZnSOD가 존재하였으며 도입시킨 SOD 밴드를 확인할 수 없었다(Fig. 26B). 이것은 잎의 경우 도입유전자의 발현이 아주 약하기 때문에 감지하기 힘든 결과라 생각된다.

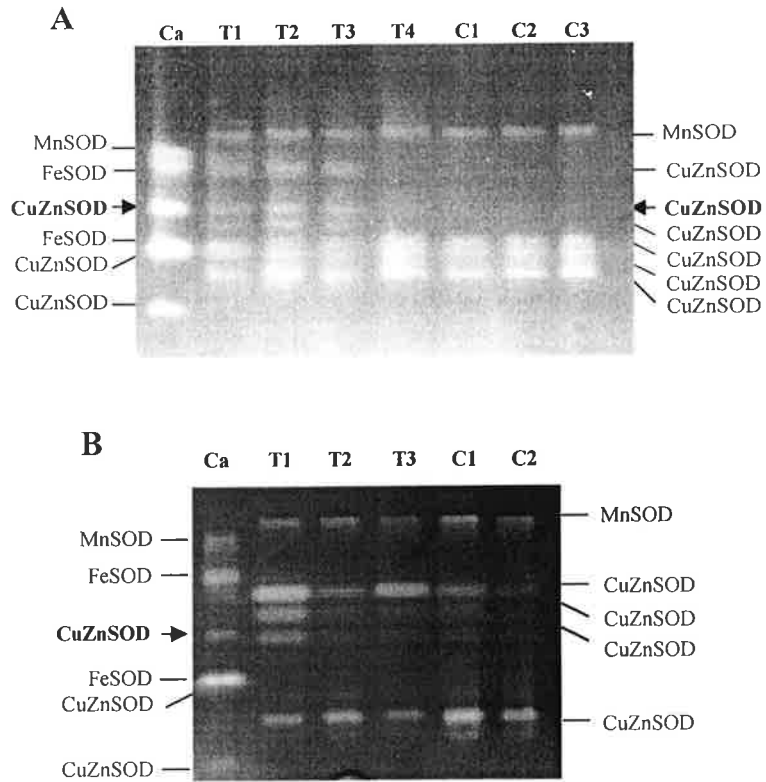


Fig. 26. Native gel assay of SOD activity in fruits (A) and leaves (B) of transgenic and non-transgenic cucumber plants. Introduced (CuZnSOD, bold letter) and endogenous SODs are indicated. SODs on the left refer to cassava callus, SODs on the right refer to cucumber. Ca: Cassava callus, T1-T4: Transgenic cucumber plants, C1-C3: Non-transgenic cucumber plants.

## 제 5 장 SOD 고함유 형질전환 토마토 개발

### 제1절 서 설

토마토의 식물체 재분화는 체세포배발생 보다는 기관발생에 의하여 더 용이한 것으로 알려져 있다. Shoot 기관분화는 정단분열조직, 자엽, 줄기, 엽병, 잎, 약, 화서 및 하배축 등에서 이루어졌으나 (Young et al., 1987; Branca et al., 1990; Compton and Veilleux 1991; Philip et al., 1996), 반면에 체세포배발생은 하배축 절편체로부터 이루어졌다 (Philip et al., 1996).

SOD 유전자를 도입시킨 형질전환 식물체의 개발은 주로 제초제(methyl viologen 등), 오존, 저온 등 환경스트레스에 대한 내성기구 해석과 환경내성 식물체 개발에 주안점을 두고 많은 연구가 보고되고 있다(Allen, 1995; McKersie et al., 1993; Perl et al., 1991; Sen Gupta et al., 1993; Van Camp et al., 1996). 그러나 vaccine 유전자를 바나나등에 도입하여 먹는 백신(edible vaccine)과 같이 SOD를 먹을 수 있는 식물조직에 과량발현하는 식물생체반응기(plant bioreactor) 시스템을 개발하고자 시도된 예는 없다(Goddijn and Pen, 1995; Dixon and Arntzen, 1997; Mason and Arntzen, 1995).

따라서 본 연구는 오이 이외에 열매를 생식하는 토마토를 재료로 하여 과실에서 SOD를 과량발현하는 형질전환 식물체를 개발하여 먹는 백신 바나나처럼 직접 SOD를 생식할 수 있는 신기능성을 지닌 토마토를 개발하고자 하였다.

## 제2절 SOD 형질전환 토마토 개발

### 1. 토마토 식물체 재분화

토마토 (cv. Pink forcer)의 자엽절편으로부터 기관발생을 경유하여 식물체로 재분화시켰다. 일주일 동안 발아시킨 유식물체의 자엽절편을 BA와 IAA가 조합된 MS배지에 배양한 결과 배양 3주 후부터 shoot과 캘러스가 각각 혹은 함께 유도되기 시작하였는데 오이와는 달리 자엽절단면이 아닌 부위에서 캘러스와 함께 shoot이 유도되었으며 유도된 shoot bud의 수도 오이에 비해 적었다. 2 mg/L BA + 0.1 mg/L IAA가 첨가된 배지에서 배양 4주 후에 32.3%의 shoot 유도율을 나타내었다(Fig. 27). 식물조직으로부터 기관발생에 의한 식물체 재분화의 경우 사용한 cytokinin의 종류에 따라 shoot 유도율이 차이를 나타내는데 본 결과는 zeatin 사용에 비해 낮은 shoot 유도율을 보였다(미발표 데이터). 유도된 shoot을 발근배지(BM배지 또는 1 mg/L IAA 첨가 배지)로 옮겨 뿌리를 유도한 다음 순화시키고 온실에서 성숙한 식물체로 성장시켰다(Fig. 28).

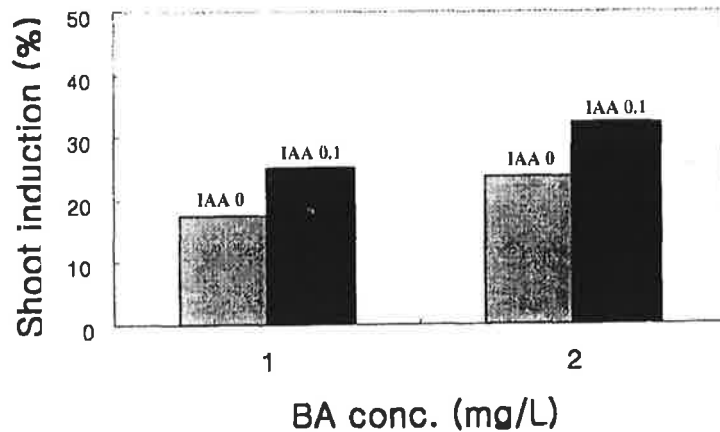


Fig. 27. Effect of plant growth regulators on shoot induction from cultured cotyledons of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Pink forcer) after 4 weeks of culture.

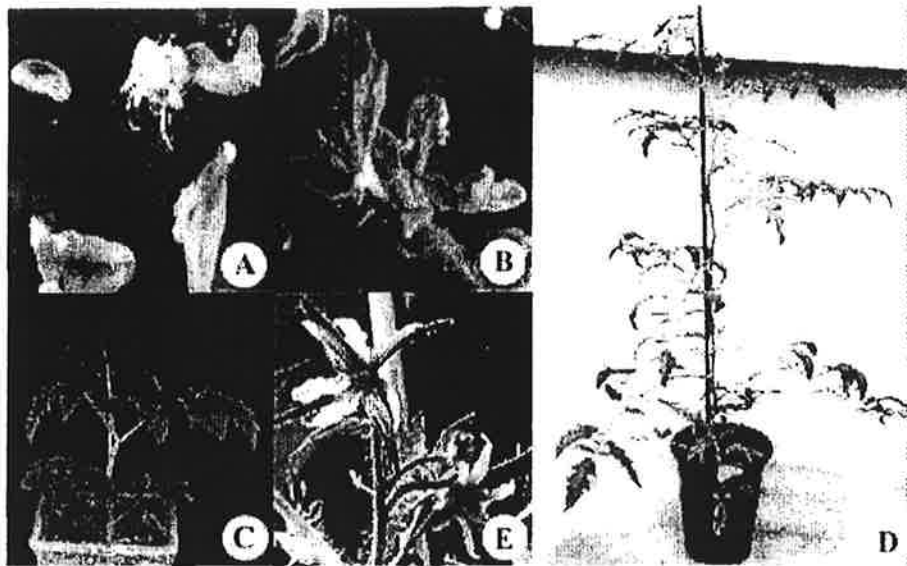


Fig. 28. Shoot induction and regeneration from the excised cotyledon of tomato seedlings. A, Shoot induction from cotyledon explants on MS medium with growth regulators. B, Root induction from shoot on rooting medium. C, Regenerated plant with acclimation in vitro. D,E, Mature plant with flowers in a green house.

## 2. 형질전환 토마토 식물체 개발 및 분석

### 1) 형질전환 토마토 식물체 개발

토마토 서광 및 꼬꼬 품종을 재료로 하여 형질전환을 시도하였다. BM 배지에서 발아 7일째 된 유식물체의 자엽절편체를 ASOp+mSOD1/pBI101이 들어있는 아그로박테리움 LBA4404와 공동배양한 후 kanamycin이 함유된 선발배지 (2 mg/L BA + 0.1 mg/L IAA + 300 mg/L claforan + 100 mg/L kanamycin)에 배양하였다. 선발배지에서 배양 3-4주 경과 후 shoot이 유도되기 시작하였으며 유도된 shoot은 1 mg/L IAA가 함유된 뿌리유도배지에 배양하여 뿌리를 유도하였다. 본엽이 3-4장 정도로 자랐을 때 genomic DNA를 분리하여 PCR로 형질전환 여부

를 분석하였다. PCR 증폭에 이용된 nptII 유전자의 primer는 sense : 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3', anti-sense: 5'-ATCGGGAGCGCGGATACCGTA-3'이며 94℃에서 1분 동안 변성, 65℃에서 1분 동안 annealing, 72℃에서 1분 동안 extension하여 총 30 주기를 반복하여 DNA를 증폭시켰다. 그 결과 형질전환된 식물체의 경우 0.7 kb의 밴드가 합성되었다(Fig. 29).

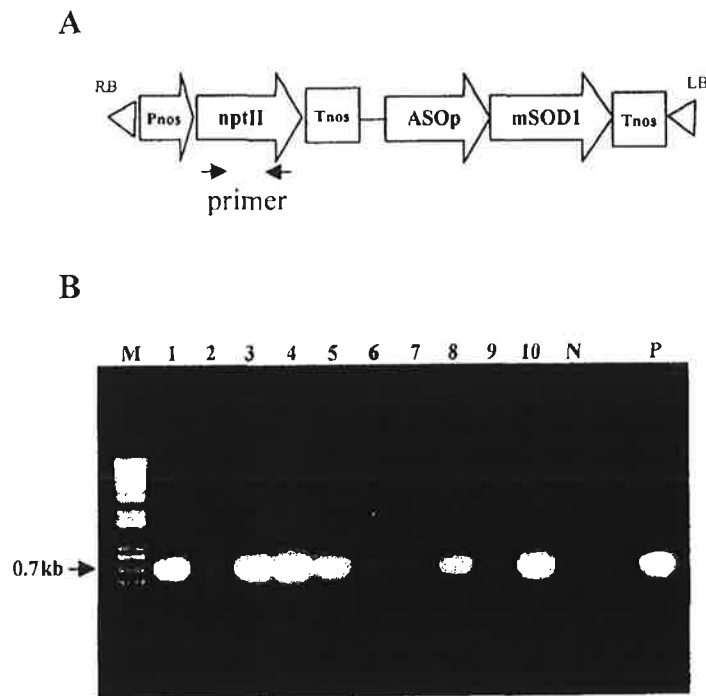


Fig. 29. PCR analysis of kanamycin resistant tomato plants. A: Partial map of ASOp+mSOD1/pBI101 vector, which is harboring ascorbate promoter, cassava CuZnSOD (mSOD1), and nptII gene as a selectable marker. B: PCR products of putative transgenic tomato plants. M: 1 kb ladder. 1-10: Kanamycin resistant tomato plants. N: no DNA as a negative control. P: ASOp+mSOD1/pBI101 plasmid DNA as a positive control. Arrows indicate the position of primer for PCR.

Kanamycin 함유배지에 선발되어 PCR로 형질전환이 확인이 된 토마토 식물체 3개체를 대상으로 Southern분석을 실시하였다. 온실에서 생육중인 토마토 식물체의 잎으로부터 genomic DNA를 분리한 다음 *EcoRI* 및 *HindIII*로 절단하여 0.8% agarose gel에 전기영동하고 Zeta Probe membrane(Bio-Rad 제품)으로 전이하였다. Kanamycin 저항성 유전자인 *nptII* 유전자(700 bp) 및 *mSOD1* 유전자의 특이부분(260 bp)을 PCR로 합성하여 각각 probe로 이용하였다. 60℃에서 24시간 동안 hybridization한 다음 membrane을 세척하고 X-ray 필름에 노출하여 밴드를 확인하였다. 그 결과 1번 식물체는 한 copy, 2번 식물체는 2 copy가, 3번은 3 copy의 도입유전자가 형질전환 되었음을 알 수 있었다(Fig. 30).

## 2) 형질전환 토마토 식물체의 SOD 활성분석

Southern 분석으로 형질전환이 확인된 토마토 식물체의 열매를 재료로 하여 발달단계별로 단백질 함량 및 SOD 활성을 분석하였다. 녹색의 어린 열매, 익기 시작한 단계의 열매, 완전히 익은 열매, 총 3단계로 나누어서 활성을 분석한 결과 전체 단백질 함량은 서광, 꼬꼬 모두 익은 단계가 진행될수록 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 31). SOD 활성은 품종에 따라 차이를 보였는데 서광의 경우 발달단계가 진행될수록 활성이 증가하는 반면 형질전환 꼬꼬의 경우 전체 SOD 활성이 열매가 익어갈수록 감소하였다. 그러나 모든 경우에 SOD 활성은 형질전환된 토마토의 열매에서 대조구보다 높았으며 또한 단계가 진행될수록 활성이 증가하는 경향을 나타내었다. 형질전환 토마토 열매의 SOD 비활성도는 초기단계에서는 거의 비슷한 경향을 나타내다가 완숙한 단계에 이르러 가장 큰 차이를 보였는데 서광의 경우 대조구 보다 약 1.6배, 꼬꼬의 경우 약 2.2배 높았다. 형질전환 토마토의 열매에서 SOD 활성이 증가한 이유는 도입한 유전자가 열매에서 높게 발현하는 프로모터를 형질전환에 이용하였기 때문이며 이러한 결과는 형질전환 오이열매에서와 같은 경향을 나타낸 것이다.

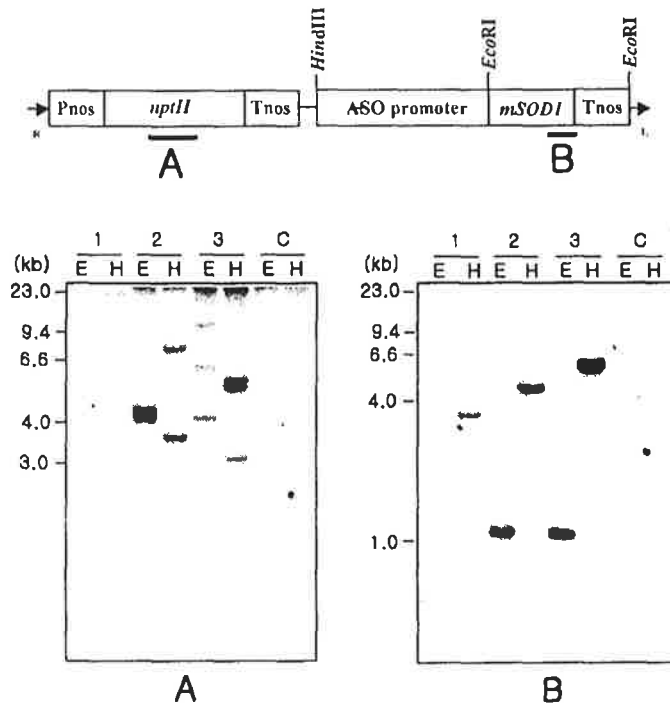


Fig. 30. Southern analysis of genomic DNA prepared from tomato leaves. Equal amounts ( $30 \mu\text{g}$ ) of genomic DNA were digested with the restriction enzymes, electrophoresed in 0.8% agarose gel, and blotted onto a membrane. The blot was hybridized with the 0.7 kb fragment of *nptII* (A) or *mSOD1* (B) as a probe, respectively. 1-3: Transgenic tomato plants. C: Nontransgenic tomato plant. The positions of molecular weight markers are shown on the left. E: *EcoRI*, H: *HindIII*



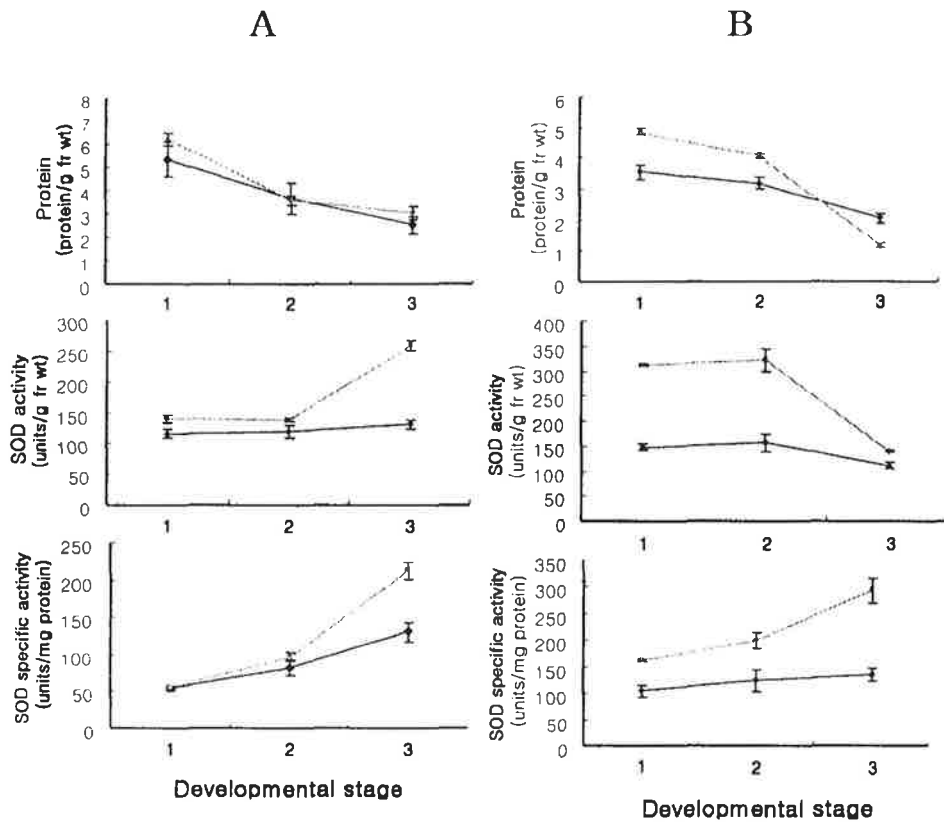


Fig. 31. Protein content and SOD activity during fruits ripening in tomato (A, cv. Pinkle forcer; B, Koko). ◆: non-transformed tomato plants. ■: transgenic tomato plants. Equal amount of total protein ( $40 \mu\text{g}$ ) was loaded to each lane. 1: immature green fruits. 2: early red fruits. 3: fully ripening-stage fruits.

# 여 백

## 위탁 연구 과제

연구제목: SOD 형질전환 과채류의 순화 및 포장적응시험

연구 기관 : 충남도농업기술원

연구 책임자 : 우인식

연구 원 : 이은모

연구 원 : 송남현

연구 원 : 조만현

연구 원 : 김현숙

# 여 백

## 위탁연구과제

### SOD 형질전환 과채류의 순화 및 포장적응시험

#### 제1절 서 설

최근 소비자의 기호도가 다양화됨에 따라 고품질 채소의 연중 안정생산 공급이 요구되고 있으며, 특히 오이, 토마토 같은 과채류의 소비 요구도가 높아지고 있다. 국내 오이 재배면적은 7,692ha로 연간 408,317톤이 생산되고 있으며, 소비형태도 계절소비에서 년중 소비로 변화되고 재배방식도 노지재배에서 시설재배로 전환되고 있다. 오이를 이용한 요리도 다양하여 각종 샐러드를 비롯한 오이냉국, 오이지, 오이장아찌, 오이피클 등의 젓산 발효식품 등 식품적 가치도 매우 우수하다. 이렇게 재배작형이 세분화되고 이용 용도가 다양화됨에 따라 재배하는 농가는 새로운 품종을 요구하고 있다. 토마토의 경우 양액재배를 비롯한 시설재배면적(4,916ha)이 점차 증가하고 있으나, 외국 품종에 비하여 국내 품종의 열세로 종자의 수입량이 점차 증가하고 있어 국내 신품종 개발에 의한 수입대체가 시급한 실정이다.

최근 고품질 오이, 토마토 육성을 위하여 조직배양 및 형질전환을 통한 품종개량 연구가 많이 수행되어, 액아 절편체로부터 직접적인 유식물체 재생 (Handley and Chambliss, 1979), 근단, 엽병, 자엽, 하배축 절편체로부터 기관분화(Chee 1990; Kim et al., 1988; Sekioka and Tanaka, 1981; Trulson and Shahin, 1986), 약배양에 의한 배상체분화 (Lazarte and Sasser, 1982), 배발생세포의 현탁배양을 통한 고빈도 식물체 재분화 (Jeong et al., 1999)를 보고한 바 있다. 한편 배양하는 절편체로부터 기관분화 양상은 배지조건이나 배지에 첨가하는 성장조절물질에 의해서 차이가 나며 배양하는 식물재료의 부위 연령에 따라서 차이가 많이 나는데, 앞서 보고된 오이 관련 논문은 주로 이런 내용을 다루고 있으나, 배양재료 간에 다른 분화 양상에 대한 해부학적, 생화학

적 특징과 관련된 보고는 거의 없는 실정이다. 또한 SOD 형질전환오이 토마토 식물체의 순화 적응성과 토양재배에 의한 생육특성, 재배양상, 품종육성가능성에 대한 보고가 거의 없는 실정이다.

본 연구는 생식을 주로 하는 오이 토마토를 대상으로 SOD 고생산하는 품종 개발로 생체내 유해활성의 산소제거 및 노화방지작용을 가진 SOD 고함유 과채류 섭취 통한 국민건강 증진과 SOD 고함유 과채류 생산으로 농가 소득증대에 목적을 두고 실시하였다. 따라서 본 연구 수행은 한국생명공학연구원에서 개발한 오이 토마토의 SOD 유전자를 도입한 형질전환 식물체를 순화, 포장적응성 및 개체별 채종을 통한 최종적으로 고부가가치 품종을 개발하고자 수행하였다.

## 제 2절 SOD 형질전환 오이 식물체의 생육특성

### 1. 재료 및 방법

#### 1) 형질전환 오이 식물체의 순화 특성

생명공학연구원에서 분양 받은 형질전환 오이 식물체를 순화 후 정식하여 재배하였다. 흥농 바이오 원예상토 1호가 들어있는 비닐포트(h 8.5cm×d 9cm, 4호)에 형질전환 식물체를 이식하여 온도  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 습도  $90\pm 5\%$ 로 제어되는 순화용 온실에 입실하여 관리하였다. 오이 형질전환 식물체를 2000년 12월 28일 1차 3주, 2001년 3월 30일 2차로 10주를 분양 받아 순화과정을 거쳐 2001년 2월 3일 3주, 2001년 4월 4일 10주를 F-clean 하우스에 정식하여 야간  $13^{\circ}\text{C}$ , 주간  $25^{\circ}\text{C}$ 내외로 가온재배를 하였다.

#### 2) 재배환경 및 생육조사

순화 완료된 식물체를 고탄배지경(perlite 1 : peatmoss 1 : vermiculite 1)에 정식하여 재배하였다. 양액공급(표 1)은 오이배지경 전용액 EC 1.5mS/cm 수준으로 1주일에 1주당 2ℓ 주었으며, 관수공급은 저온기 1일 200 ml, 고온기에

는 500ml씩 2회 공급하고 필요시 추가로 공급하였다. 또한 식물의 생육상태를 관찰하면서 유인, 적엽, 측지제거 등을 하면서 주기적으로 살충제 및 살균제를 살포하였다.

<표 1> 배양액 성분표

무기성분	mg/L	무기성분	mg/L
KNO <sub>3</sub>	707	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	76	MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	2
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	590	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.22
MgSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	246	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.05
EDTA - Fe	15	NaMoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.02

오이 형질전환 식물체의 생육특성을 보기 위하여 줄 내립 주지재배를 하였으며, 지상부 생육 특성은 정식 후 생육 30일과 60일에 초장, 경경, 절수, 엽장, 엽폭, 절성을 조사하였다.

### 3) 형질전환 식물체의 교배방식에 따른 종자형성 특성

형질전환 식물체의 과실 및 종자 채종을 위하여 3차에 걸쳐 인공수분을 하였다. 개체당 수확과수, 1과중을 조사하였으며, 수분 45일 후에 과실내의 종자를 배, 배유, 종피가 정상적으로 발달된 종자(건진)와 배와 배유는 없고 종피만 가진 종자(쪽정이)로 구분하여 조사하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 1) 형질전환 오이 식물체의 순화 및 활착율

형질전환 오이 식물체를 2차에 걸쳐 13주를 순화 처리한 결과 1차는 2개체가 순화 되어 67% 순화되었으며, 2차에는 10개체가 순화되어 100% 순화되어 전체적으로 92%로의 순화율을 보였다. 또한 순화 완료된 개체를 재배용기(가로50×세로30×높이25cm)에 정식한 정식 활착율은 12개체가 활착되어 100%의 활착율을 보였으나, 생육 초기 저온과 일조 부족으로 생육이 약간 지연되었다(표

2).

<표 2> 형질전환 오이 식물체 순화 및 활착율

구 분	이식개체수			순화개체수(%)	활착개체수(%)
	정상	기형	계		
1 차	2	1	3	2(67)	2(100)
2 차	9	1	10	10(100)	10(100)
계	11	2	13	12(92)	12(100)

## 2) 형질전환 오이 식물체의 정식 후 30일 생육특성

형질전환 오이 식물체의 정식 후 30일의 지상부 생육 특성은 표3과 같다. 1차 정식한 형질전환 개체 해동32의 생육양상은 초장 46cm, 마디 13개로 절간이 매우 짧고 성장속도가 매우 느렸으며, 잎은 정상개체에 비하여 두껍고 축엽이 심하고 만지면 잎이 잘 부서지는 현상을 보였다. 해동43은 초장 159cm로 생육이 매우 양호하였으며 잎도 정상적으로 발달하였다. 2차 정식한 형질전환 개체 중 3개체는 초장, 엽장, 엽폭 모두 정상적인 생육을 보였으며 성장속도도 빨랐다. 그러나 해동#6은 초장 14cm, 마디가 7개로 절간이 매우 짧고 지제부에 잎이 총생하는 양상을 보였다.

<표 3> 오이 형질전환 식물체의 지상부 생육특성(정식후 30일)

구 분	개 체	초장 (cm)	경경 (mm)	마디수 (개)	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	잎형태
1 차	해동32(SOD)	46	5.7	13	19.5	21.0	비정상
	해동43(대조)	159	7.2	19	21.5	23.0	정상
2 차	해동2-1(SOD)	195	7.0	34	21.5	25.0	정상
	해동2-2(SOD)	170	7.0	29	22.0	24.5	정상
	해동#15(SOD)	185	6.7	26	23.5	25.5	정상
	해동#6(SOD)	14	6.5	7	19.0	21.0	비정상
	해동5(대 조)	180	7.5	25	22.5	27.0	정상

1) 조사일 1차 분양묘 : 3. 5, 2차 분양묘 : 5. 4



### 3) 형질전환 오이 식물체의 정식 후 60일 생육특성

형질전환 식물체의 자화 발생정도와 착과 양상을 보기 위하여 생육 60일 후 전반적인 생육특성은 표4과 같다. 1차에 정식한 개체는 생육 최성기에 저온기를 거쳐 2차 정식 개체에 비하여 성장속도가 느렸으나, 자화와 용화 비율에는 영향을 미치지 않았다. 그러나 2차 정식한 개체는 생육 최성기에 온도 상승에 따른 성장속도가 빨라 마디수와 절간장이 1차 개체들에 비하여 각각 38%, 42%로 길었으며 절성도 12%로 증진되었다. 해동32, 해동#6 개체의 경우 성장 중 주지 성장점이 고사하여 생장이 멈추는 현상을 보였으며, 마디마다 자화가 4~5개 총생하여 100%로 자화만 발생하는 특징을 보였다.

<표 4> 오이 형질전환 식물체의 생육특성(정식후 60일)

구 분	개 체	초장 (cm)	경경 (mm)	절간장 (cm)	절 수 (개)	자화수 (개)	절성성 (%)
1 차	해동32(SOD)	65	6.7	3.6	18	10	56
	해동43(대 조)	269	7.7	7.4	36	27	75
	계	167	7.2	5.5	27	18.5	66
2 차	해동2-1(SOD)	380	8.0	8.4	45	33	73
	해동2-2(SOD)	325	9.5	7.7	42	30	71
	해동#15(SOD)	365	8.5	8.1	45	29	64
	해동# 6(SOD)	80	8.5	5.3	15	15	100
	해동 5(대조)	375	9.0	8.3	45	29	64
	계	305	8.7	7.6	38.4	27.2	74

1) 조사일 1차 분양묘 : 4. 4, 2차 분양묘 : 6. 4

형질전환 개체의 과실 특성을 조사하기 위하여 개화 후 12~13일 성장한 과실을 수확하여 과장, 과경, 1과중을 조사하였다. 해동32와 해동#6의 경우 마디마다 자화가 4~5개 총생하여 과실 상호간의 양분 경합에 의하여 개화시 자방 크기로 성장 정지되었으나, 적과 하면 비대기 시작되나 성장 속도가 다른 개체

에 비하여 매우 느렸다. 또한 정상과 자방의 길이는 길고 꽃받침이 녹색이었으나, 해동32와 해동#6은 자방장이 짧고 꽃받침이 꽃잎과 구분이 확실하지 않고 황색 띠었으며, 과실도 비정상적으로 발달하여 곡과로 성장하였다(그림 1). 그러나 다른 형질전환 개체들은 모두 정상적인 과실 비대 양상을 보였으며 20개 내외의 착과 양상을 보였다(표 5).

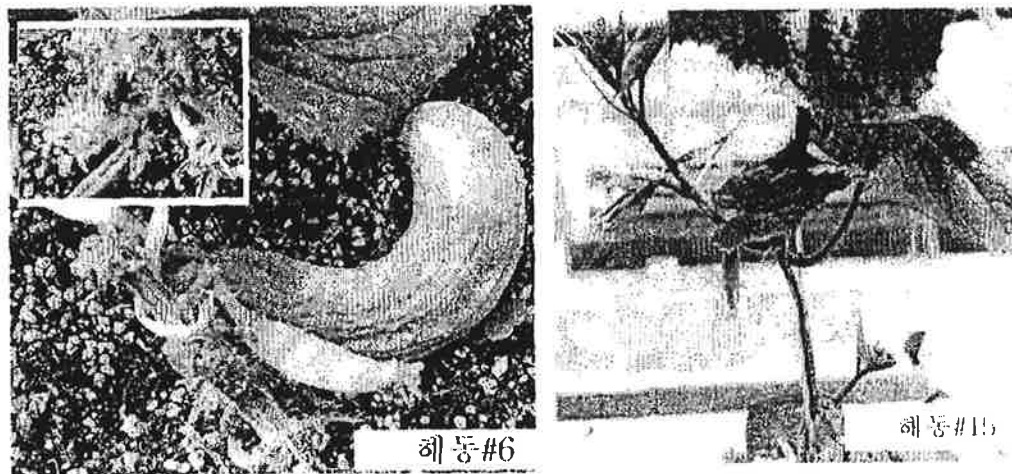


그림 1. 형질전환 오이 식물체의 개화특성 및 과실 생육 특성

<표 5> 오이 형질전환 식물체의 과실 생육특성(개화 12~13일후)

구분	개체	자방장 <sup>1)</sup> (cm)	과장 (cm)	과경 (mm)	1과중 (cm)	착과수 (개)	과실형태
1 차	해동32(SOD)	3.2	18	35	180	3	곡과
	해동43(대조)	4.5	22	35	220	8	정상과
2 차	해동2-1(SOD)	4.1	23	38	190	13	정상과
	해동2-2(SOD)	4.2	23	38	190	20	정상과
	해동#15(SOD)	4.3	22	35	165	22	정상과
	해동# 6(SOD)	3.3	15	27	110	3	곡과
	해동 5(대조)	4.5	23	38	200	23	정상과

1) 개화당시 자방의 길이

#### 4) 형질전환 오이 식물체의 교배방식에 따른 종자특성

형질전환 개체의 교배방식에 따른 종자의 형성양상을 보기 위하여 개체별로 자가, 타가, 방임수분 하여 45일 후 종자를 채종한 결과는 표6과 같다. 형질전환 개체에서 건실한 종자만 가진 과실은 타가수분에 2과을 수확하였으며, 정상 개체에서는 방임수분에 1과와 자가수분에서 1과를 얻었으며, 종자가 전혀 없는 과실(무)과 쪽정이가 가장 많은 교배양식은 자가수분과 방임수분이었다.

<표 6> 형질전환 오이 교배방식에 따른 과실특성 및 종자채종

구 분	방 임 수 분				자 가 수 분				타가수분			
	조사 과수	무 과	건 실 (건)	쪽 정 이 (쪽)	조사 과수	무 과	건 실 (건)	쪽 정 이 (쪽)	조사 과수	무 과	건 실 (건)	쪽 정 이 (쪽)
형질전환개체	4	2	0	2	8	2	0	6	6	1	2	3
정 상 개 체	5	0	1	4	14	3	1	10	3	0	0	3

1) 수분 : 개화당일 오전 9시

#### 5) 교배방식에 따른 과실의 종자채종 특성

교배방식에 따른 종자결실은 표 7에서 보는 바와 같이 형질전환 개체의 경우 방임수분이 1과중 811 g으로 가장 무거웠으며, 자가수분 792g이었으며, 타가수분 783 g으로 가장 낮게 나타났다. 형질전환 개체의 자가나 타가수분의 경우 수분 후 과실 비대가 이루어지지 않고 과실이 누렇게 말라붙는 미이라과 발생비율이 높았으며, 건실종자의 채종은 재배시기에 관계없이 타가수분에서 84립의 종자를 얻었으며, 정상개체의 경우 자가수분에서 100립, 방임수분에서 15립을 채종 하였다(그림 2).

<표 7> 형질전환오이의 교배양식에 따른 과실의 종자채종 특성

구 분	방임수분			자가수분			타가수분		
	1과중 (g)	종자수		1과중 (g)	종자수		1과중 (g)	종자수	
		건실	쪽정어		건실	쪽정어		건실	쪽정어
형질전환개체	811	0	18	792	0	65	783	84	38
정상개체	756	15	259	789	100	427	850	0	105

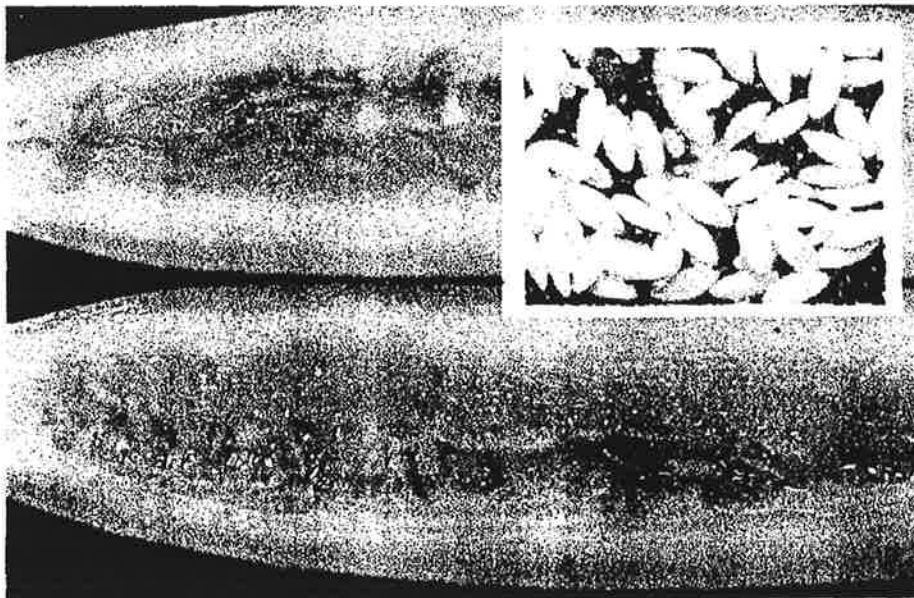


그림 2. 형질전환 오이 과실의 종자형성 양상 및 종자 채종

형질전환 개체의 전반적인 종자 채종이 미진하였다. 교배방법에 따른 건전 종자 형성이 낮은 것은 채종은 위한 개화 수분 후 주간의 기온이 40℃전후 고온기에 성장했기 때문이다. 이는 40℃이상에서는 화분이 발아를 하지않고, 발아하더라도 수정은 수분 후 24~48시간 사이에 이루어지기 때문에 화분관이 배낭내로 침입하여 수정하기가 곤란하였던 것으로 사료된다. 오이의 성표현은 복

대립유전자에 의해 지배되지만 그 발현은 환경요인의 영향을 받기 쉽고, 주간  
의 온도가 영향을 주지만 주간은 광합성의 적온을 유지, 야간 13~15℃를 경과  
하면 효과적이다. 온도 다음으로 일장의 영향이 크고 야생종을 포함해서 많은  
품종은 단일조건하에 자화분화가 촉진된다. 그러나 일장조건으로 성표현이 좌  
우되지 않는 품종도 적지 않다. 화아의 성분화를 유도하는 내적요인으로는 내생  
에틸렌이 높으므로 자화분화가 촉진되고 내생지베렐린이 높으므로 응화분화가  
촉진된다는 것이 다양한 시험으로 밝혀려고 하지만 성결정의 생리적인 메카니  
즘에 대해서는 아직 확실하지 않다.

본 실험에서는 관행재배와 달리 10~13절까지 응화 착생 비율이 높고 14절  
부터는 자화 착생비율이 높아 수분에 많은 어려움이 있었다. 또한 먼저 수분  
착과 시킨 과실로 양분공급이 다량 전류 되어 14절 위로 착과 되더라도 과실로  
양분공급이 적어 생리적 장애에 의한 미이라과 발생율이 높았으며, 착과 결실  
되더라도 건전종자 형성비율이 낮은 것으로 사료되었다.

### 제 3절 SOD 형질전환 토마토의 생육특성 및 생산성 검정

#### 1. 재료 및 방법

##### 1) 형질전환 토마 식물체의 순화 및 재배환경

형질전환 토마토 식물체를 2000년 8월 2일 4주 분양 받아 2000년 8월 24일  
정식하여 재배관리 하였으며, 2000년 11월 13일 11개체를 분양 받아 12월 13일  
정식하여 오이와 같은 조건으로 재배관리하였다. 순화 완료된 식물체를 perlite  
고형배지경 든 플라스틱 재배용기(h25cm×d30cm) 정식하여 재배하였다. 양액은  
오이배지경 전용액 EC 1.5mS/cm 수준으로 1일에 200ml씩 공급하였으며, 관수  
공급은 저온기 1일 200ml, 고온기에는 500ml씩 2회 공급하고 필요시 추가로 공  
급하였다. 재배환경은 오이와 같은 하우스내에서 같은 조건으로 재배하였다.

##### 2) 생육조사

토마토 형질전환 식물체의 생육특성을 보기 위하여 토마토는 8월 4일 정식하여 12월 3일까지 측지를 제거하고 주지를 유인 재배하면서 초장, 마디수, 화방수, 과수, 과중, 당도 등의 전반적인 생육특성을 조사하였다. 형질전환 토마토의 일반적인 착과 양상을 보기 위하여 인위적인 착과제 처리 없이 자연상태로 착과시켜 과실의 발육상태를 조사하였다.

### 3) 형질전환 토마토 삽목묘의 생육특성 및 생산성검정

형질전환 토마토의 토양재배 적응성 및 생육특성을 검토하기 위하여 서광 2개체와 꼬꼬 2개체를 3월 12일 삽목하여 발근된 삽목묘를 4월 12일 재식거리 90×40cm로 비닐하우스 내 토양에 한줄씩 정식하여 재배하였다. 주요 생육특성은 제1화방에서 6화방까지의 화방수, 수확과수, 초장, 경경, 엽장, 엽폭, 절간장 등 지상부 생육과 과실의 특성을 조사하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 1) 형질전환 토마토 식물체의 순화 및 활착율

형질전환 토마토 식물체를 2차에 걸쳐 15개체를 분양 받아, 흥농 바이오 원예상토 1호가 들어있는 비닐포트(h8.5cm×d 9cm, 4호)에 이식하여 순화한 결과 15개체 모두 순화되어 100% 순화율을 보였다. 순화가 완료된 개체를 하우스 내 고품배지에 정식 후 활착율을 조사결과 15개체가 모두 활착되어 100% 활착율을 보였으며, 초기 생육도 비교적 양호하였다(표 8).

<표 8> 형질전환 토마토 식물체 순화 및 활착율

구 분	이식개체수			순화개체수(%)	활착개체수(%)
	정상	기형	계		
토마토 1 차	4	0	4	4(100)	4(100)
2차	11	0	11	11(100)	11(100)
계	15	0	15	15(100)	15(100)

## 2) 형질전환 식물체의 생육특성

형질전환 된 토마토 식물체를 순화 완료 후 식물체 생육특성을 조사하기 위하여 8월 4일 고행배지경에 정식하여 12월 3일까지 재배한 식물체 생육특성은 표 9와 같다. 형질전환 된 서광 802-1개체의 초장은 259cm로 화방수가 8개로 대조구에 비하여 60%로 많았으나 화방당 착과수는 2.6개로 다소 떨어졌다. 방울토마토 계통인 꼬꼬 802-4는 1 화방당 12.8개의 토마토를 수확하여 다른 개체에 비하여 주당 수확량이 가장 많았다. 형질전환 과실의 외관은 일반 재배 품종과 차이가 없었으며, 서광 802-1개체가 당도 6.5 °BX로 대조구에 비하여 다소 떨어졌으나, 꼬꼬802-3, 802-4는 대조구에 비하여 당도가 다소 높게 나타났다.

<표 9> 형질전환 토마토 식물체의 지상부 생육 및 과실특성

구분	개 체	초장 (cm)	마디수 (개수)	화방수 (개)	과 수 (개/화방)	과고 (cm)	과경 (cm)	1과중 (g)	당 도 (°BX)
서광	802-1(SOD)	259	37	8	2.6	4.2	6.3	86.0	6.5
	802-2(대조)	187	29	5	3.0	4.4	5.5	87.0	6.9
꼬꼬	802-3(SOD)	221	40	7	11.1	2.4	2.7	7.2	9.3
	802-4(SOD)	202	32	8	12.8	2.3	2.7	10.0	9.5
	53-1(대조)	250	38	7	10.8	2.6	3.0	11.7	9.0

## 3) 형질전환 토마토 삽목묘의 생육특성 및 생산력검정

### 가) 형질전환 토마토 토양재배 지상부 생육조사

형질전환 된 서광 2개체와 꼬꼬 3개체의 발근 된 삽목묘를 4월 12일 하우스내 토양에 정식하여 4개월간 토양 재배하면서 지상부 생육특성을 조사한 결과는 표10 및 그림 3과 같다. 초기 생육 및 활착은 모두 양호였으며, 서광 802-1개체는 대조구에 비하여 지상부 생육은 다소 떨어졌으나, 주당 화방수가

4.3개로 화방당 3.1개의 토마토를 수확하였다. 방울토마토 계통인 꼬꼬802-3 개체가 화방수 21.1개로 가장 많았으며, 화방당 15.4개의 과실을 수확하였다.

<표 10> 형질전환 토마토 지상부 생육조사(정식 후 90일)

구분	Line	초장 (cm)	경경 (cm)	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	절간장 (cm)	화방수 (cm)	과수 (개/화방)	착과율 (%)
서광	802-1(SOD)	163.0	11.1	43.5	45.2	6.2	4.3	3.1	73
	802-2(대조)	167.5	13.9	48.5	45.7	7.1	4.2	3.0	70
	802-3(SOD)	179.7	13.2	40.5	35.0	5.2	21.1	15.4	73
꼬꼬	802-3(SOD)	175.8	12.4	40.7	35.5	6.3	18.5	13.6	73
	53-1 (대조)	180.5	12.8	39.3	38.8	5.9	16.2	12.8	78

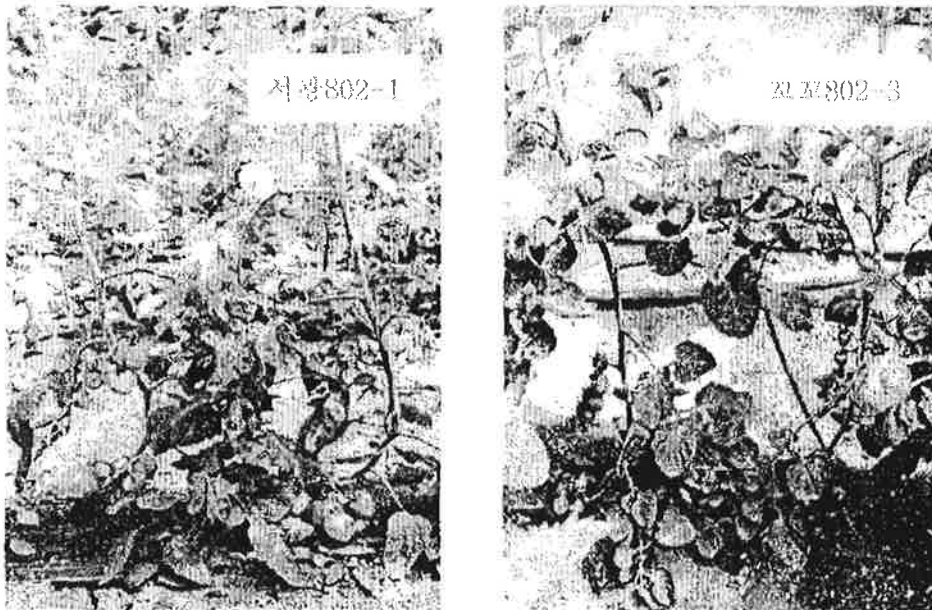


그림 3. 형질전환 토마토 삼목묘의 제1화방 착과 생육상태



나) 형질전환 토마토 과실특성

형질전환 개체의 과실특성을 조사하기 위하여 7월 18일 3화방에서 수확한 과실을 각각 5개씩 조사한 결과 표 11와 같다. 중대과중(평균190-220 g)인 서광 802-1이 과중이 172.3 g으로 대조구에 비하여 작았으며, 당도, 산도 경도도 대조구에 비하여 다소 떨어졌으나, 열과율은 15%로 대조구에 비하여 상품과 수확비율이 높았다. 꼬꼬802-3개체가 과고 2.9 cm 과경3.1 cm 1과중이 16.8 g으로 과실의 모양이 가장 좋았다. 열과율도 24%으로 상품과 수확이 가장 많았다.

<표 11> 형질전환 토마토 과실 특성조사

구분	Line	과고 (cm)	과경 (cm)	1과중 (g)	당도 (°BX)	과즙 pH	경도 (kg/cm <sup>2</sup> )	열과율 (%)
서광	802-1(SOD)	5.9	6.9	172.3	6.0	4.4	0.8	15
	802-2(대조)	6.3	7.4	230.2	7.4	4.5	1.1	19
	802-3(SOD)	2.9	3.1	16.8	8.1	4.5	1.2	24
꼬꼬	802-4(SOD)	2.8	3.1	15.0	9.0	4.4	1.2	27
	53-1 (대조)	2.8	3.1	16.4	8.8	4.5	1.1	36

형질전환 토마토의 토양적응성 검토 결과 일반 재배품종과 생육 특성 및 결실 상태에 큰 차이점이 없었으며, 형질전환개체의 수확기 열과율이 낮아 상품과 수확이 많았다.

열과의 발생은 과피가 노화해서 탄력성을 잃거나 토양의 수분이 급격히 변화하거나 직사광선의 직접적인 영향으로 발생하기 쉬우므로 이를 예방하기 위해서는 토양수분의 변화를 적게하여 건조의 영향이 직접적으로 받지 않도록 뿌리의 발달을 좋게 하여야 하므로 퇴비의 다량시용과 심경이 효과적이고 비대가 완료된 과실은 직사광선, 수분이 과면에 닿지 않도록 가급적 잎속에 넣어 관리하는 것이 바람직하다고 사료된다.

## 연구성과 : 특허 및 논문 목록

### [국내특허]

1. 슈퍼옥사이드 디스뮤타제를 대량생산하는 형질전환된 식물체, 그의 제조방법 및 용도.  
등록번호 270910호 (등록일 00. 8. 8)
2. 종자식물 유식물체의 하배축절단면에서 부정아를 고빈도로 유도하는 방법 및 이로부터 재분화 식물체와 형질전환 식물체를 제조하는 방법.  
출원번호 98-33947 (출원일 98.8.21)
3. 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 및 아스코르베이트 퍼옥시다제 유전자를 동시에 함유하는 벡터 및 그에 의해 형질전환된 식물체.  
출원번호 99-57774 (출원일 99. 12. 16)

### [국외특허]

1. Method for the producing transgenic cucumber that produces high levels of superoxide dismutase.  
미국특허등록(US006084152, 등록일 00.7.4)

### [국내 논문]

1. 김재훈 등 (1998) 오이(*Cucumis sativus* L.) 기관분화 및 체세포배발생을 통한 식물체 재분화. 식물조직배양학회지. 25(2): 125-129
2. 김재훈 등 (1998) 형질전환 오이 (*Cucumis sativus* L.) 식물체에서 완두 superoxide dismutase 유전자의 발현. 식물조직배양학회지 25(3): 201-206
3. 이은모 등 (2000) 오이 캘러스 분화시 광의 영향, 형태발생 및 단백질 함량. 식물조직배양학회지. 27(3): 213-217

## [국외 논문]

1. Lee HS et al. (1999) Molecular characterization and expression of a cDNA encoding copper/zinc superoxide dismutase from cultured cells of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Molecular General and Genetics* 262: 807-814.
2. Kim JW et al. (2000) High frequency shoot induction and plant regeneration from cotyledonary hypocotyl explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. *Journal of Plant Physiology* 157: 136-139.
3. Lee HS et al. (2001) Transgenic Cucumber That Produces High Levels of an Anti-aging superoxide Dismutase. *Plant Mol Biol* (in preparation)
4. Park EJ et al. (2001) Development of transgenic tomato overproducing superoxide dismutase in fruits. *Phytochemistry* (in preparation)

## 참 고 문 헌

- Allen RD (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol* 107: 1049-1054.
- An G (1987) Binary vectors for plant transformation and promoter analysis. *Method in Enzymol* 153: 292-305.
- Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G (1987) Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem* 22: 111-180.
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44: 276-287
- Beauchamp CO, Fridovich I (1973) Isoenzymes of superoxide dismutase from wheat germ. *Biochim. Biophys. Acta* 317:50-64.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Branca C, Bucci G, Domiano P, Ricci A, Torelli A, Bassi M (1990) Auxin structure and activity on tomato morphogenesis in vitro and pea stem elongation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 24: 105-114.
- Cade RM, Wehner TC, Blazich FA (1987) Organogenesis and embryogenesis from cucumber (*Cucumis sativus* L.) cotyledon-derived callus. *HortScience* 22: 1130.
- Cannon RE, Scandalios JG (1989) Two cDNAs encode two nearly identical Cu/Zn superoxide dismutase proteins in maize. *Mol Gen Genet* 219: 1-8.
- Chee PP, Tricoli DM (1988) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension cultures of *Cucumis sativus* L. *Plant Cell Rep* 7: 274-277.

- Chee PP (1990) High frequency of somatic embryogenesis and recovery of fertile cucumber plants. HortScience 25: 792-793.
- Chee PP, Slightom JL (1991) Transfer and expression of cucumber mosaic virus coat protein in the genome of *Cucumis sativus*. J. Am. Soc. Hort. Sci. 116: 1098-1102.
- Cohen G (1988) Oxygen radicals and parkinson's disease. In "Oxygen radicals and tissue Injury" (Halliwell B ed.). Federation of American Societies for Experimental Biology, Bethesda, MD pp. 130-135.
- Colijin-Hooymans CM, Bouwer R, Dons JJM (1988) Plant regeneration from cucumber protoplasts. Plant Cell Tissue Organ Culture 12: 147-150.
- Colijin-Hooymans CM, Hakkert JC, Jansen J, Custers JBM (1994) Competence for regeneration of cucumber cotyledons if restricted to specific developmental stages. Plant Cell Tissue Organ Culture 39: 211-217.
- Compton ME, Velleux RE (1991) Shoot, root and flower morphogenesis on tomato inflorescence explants. Plant Cell Tissue Organ Cult 24: 223-231.
- Dong JZ, Jia SR (1991) High efficiency plant regeneration from cotyledons of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.). Plant Cell Rep 9: 559-562.
- Filipe P, Emerit I, Vassy J, Rigaut JP, Martin E, Freitas J, Fernandes A (1997) Epidermal localization and protective effects of topically applied superoxide dismutase. Exp Dermatol 6: 116-121.
- Foyer CH, Mullineaux PM (1994) Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Gambley RL, Dodd WA (1990) An in vitro technique for the production de novo of multiple shoots in cotyledon explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plant Cell Tissue Organ Cult 20: 177-183.
- Gambley RL, Dodd WA (1991) The influence of cotyledons on axillary and adventitious shoot production from cotyledonary nodes of *Cucumis*

- sativus* L. (cucumber). J Exp Bot 32: 1131-1135.
- Goddijin OJM, Pen J (1995) Plants as bioreactors. TIBTECH 13: 379-387.
- Handley LW, Chambliss OL (1979) In vitro propagation of *Cucumis sativus* L. HortScience 14:22-23.
- Huh GH, Lee SJ, Bae YS, Liu JR, Kwak SS (1997) Molecular cloning, and characterization of cDNAs for anionic and neutral peroxidases from suspension cultured cells of sweet potato and their differential expression in response to stress. Mol Gen Genet 255: 382-391.
- Jeong WJ, Woo JW, Park HG, Choi KS, Liu JR (1999) High frequency plant regeneration in embryogenic cell suspension cultures of cucumber. Korean J Plant Tissue Culture 26: 289-291.
- Jia SR, Fu YY, Lin Y (1986) Embryogenesis and plant regeneration from cotyledon protoplast culture of cucumber (*Cucumis sativus* L.). J Plant Physiol 124: 393-398.
- Kim KY, Huh GH, Lee HS, Kwon SY, Hur Y, Kwak SS (1999) Molecular characterization of two anionic peroxidase cDNAs isolated from suspension cultures of sweet potato. Mol Gen Genet 261: 941-947.
- Kim SG, Chang JR, Cha HC, Lee KW (1988) Callus growth and plant regeneration in diverse cultivars of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plant Cell Tissue Organ Culture 12: 67-74.
- Kim SK, Kwak SS, Jung KH, Min SR, Park IH, Liu JR (1994) Selection of plant cell lines for high yields of peroxidase. J Biochem Mol Biol (formerly Korean Biochem J) 27: 132-137.
- Kim YK, Kwon SI, An CS (1997) Isolation and characterization of cytosolic copper/zinc superoxide dismutase from *Capsicum annuum* L. Mol Cells 7: 668-673.
- Lazarte JE, Sasser CC (1982) Asexual embryogenesis and plantlet development in anther culture of *Cucumis sativus* L. HortScience 17:

88-89.

Lin CT, Yeh KW, Kao MC, Shaw JF (1993) Cloning and characterization of a cDNA encoding the cytosolic copper/zinc-superoxide dismutase from sweet potato tuberous root. *Plant Mol Biol* 23: 911-913.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275

Mason HS, Arntzen CJ (1995) Transgenic plants as vaccine production systems. *TIBTECH* 13: 388-392.

McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase, an enzymatic function for erythrocyte, *J Biol Chem* 244: 6049-6055.

Mekersie BD, Chen Y, De Beus M, Bowley SR, Bowler C (1993) Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* 103: 1155-1163.

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

Naqvi SM, Park KS, Yi SY, Lee HW, Bok SH, Choi D (1998) A glycine-rich RNA-binding protein gene is differentially expressed during acute hypersensitive response following tobacco mosaic virus infection in tobacco. *Plant Mol Biol* 37: 571-576.

Perl-Treves R, Galun E (1991) The tomato Cu-Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Plant Mol Biol* 17: 745-760.

Raharjo SHT, Hernandez MO, Zhang YY, Punja JK (1996) Transformation of pickling cucumber with chitinase-encoding genes using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 15: 591-595.

Rajasekaran K, Nullins MG, Nair Y (1983) Flower formation in vitro by hypocotyl explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Ann Bot* 51:

417-420.

Sakamoto A, Ohsuga H, Tanaka K (1992) Nucleotide sequences of two cDNA clones encoding different Cu/Zn-superoxide dismutases expressed in developing rice seed. *Plant Mol Biol* 19: 323-327.

Sekioka TT, Tanaka JS (1981) Differentiation in callus cultures of cucumber(*Cucumis sativus* L.). *HortScience* 16:45

Sen Gupa A, Heinen J, Holaday AS, Burke JJ, Allen RD 1993. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that over-express chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1629-1633.

Slater RF (1984) Free-radical mechanism in tissue injury. *Biochem J* 221: 1-15.

Sun J, Chen Y, Li M, Ge Z (1998) Role of antioxidant enzymes on ionizing radiation resistance. *Free Radical Biol & Med* 24: 586-593

Trulson AJ, Shahin EA (1986) In vitro plant regeneration in genus *Cucumis*. *Plant Science* 47:35-43

Van Camp W, Willekens H, Bowler C, Van Montagu M, Inze D, Reupold-Popp P, Sandermann H, Langebartels C (1994) Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage. *Bio/Technology* 12: 165-168.

Yoshida K, Ito T, Nozawa H, Ohkawa J, Shinmyo A (1994) Sequence requirement of 5-upstream region of the ascorbate oxidase gene for organ-specific expression in cucumber. *Ann New York Acad Sci* 721: 245-247.

You SH, Kim SW, Kim SH, Liu JR, Kwak SS (1996) Selection and isoenzyme analysis of plant cell lines for high yields of superoxide dismutase. *Korean J Plant Tissue Culture* 23: 103-106.



Young R, Kaul V, Williams EG (1987) Clonal propagation in vitro from immature embryos and flower buds of *Lycopersicon peruvianum* and *L. esculentum*. Plant Sci 52: 237-242.

Ziv M, Gadasi G (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.