

GOVP1200134864

(19th)

631.52

L293II

최 종
연구보고서

**포르피린 생합성 관련 효소 연구와 유전자 조작을
통한 제초제 저항성 식량 작물 개발**

Studies on the Enzymes of the Porphyrin Pathway and
Development of Herbicide-Resistant Crops through Gene
Manipulation

연구기관

전남대학교

농 립 부

최 종 보 고 서

1996년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 포르피린 생합성 관련 효소 연구와 유전자 조작을 통한 제초제 저항성 식량 작물 개발에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부

2. 최종보고서 디스켓 1매

2001년 10월 31일

주관연구기관 : 전남대학교

총괄연구책임자 : 구자욱 (인)

주관연구기관장 : 총장 정석중 (직인)

농 립 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “포르피린 생합성 관련 효소 연구와 유전자 조작을 통한 제초제 저항성 식량 작물 개발에 관한 연구” 과제 (세부과제 “*Bacillus subtilis*와 벼로부터 Protox 유전자의 클로닝, 발현 및 Protox 효소의 반응 기작 비교 연구”, “광활성 제초제에 대한 형질전환 식물체의 생리, 생화학적 반응”, “광활성 제초제에 대한 저항성 형질전환 작물 개발”, “형질전환 식물의 환경 반응 특이성, 생산성 비교 연구”에 관한 연구)의 최종보고서로 제출합니다.

2001년 10월 31일

주관연구기관명 : 전 남 대 학 교

총괄연구책임자 : 구 자 욱

세부연구책임자 : 국용인, 백경환, 이희재,

최규환, 한옥수

연 구 원 : 김묘정, 김영민, 김영선, 김영주,
김원영, 김춘근, 나재혁, 박재여,
서용학, 송진희, 신지산, 이성범,
이은경, 이재홍, 오봉석, 장상은,
장선미, 정민숙, 정은주, 정정성,
정하일, 조경원, 천상욱, 한성욱,
혼타브라크

요 약 문

I. 제 목

포르피린 생합성 관련 효소 연구와 유전자 조작을 통한 제초제 저항성 식량 작물 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

DPE계를 포함하는 많은 종류의 광활성 제초제들은 광활성에 의한 활성 산소의 방출과 이로 인한 지질의 과산화 작용으로 급격한 살초효과를 나타내기 때문에 잔류 독성이 매우 낮을 뿐만 아니라 비수용성으로 토양입자에 쉽게 흡착되며 광산화에 의하여 쉽게 분해되는 경향이 있어서 차세대의 바람직한 제초제로 선택될 수 있는 장점을 지니고 있지만 식물종간의 선택성이 크게 결여되어 몇 가지 작물을 제외하고는 작물의 생육기에 제초 목적으로 사용하기에는 어려운 제한점을 지니고 있다. 이들 종류 제초제의 선택성 제고를 위해서는 이들 제초제의 화학 구조를 골격으로 한 신규 제초제의 개발을 들 수 있으나 신규 제초제 화합물의 합성에 드는 시간과 경비 및 노력을 고려한다면 기존의 광활성 제초제를 활용하면서 작물에 대한 고도의 선택성을 나타낼 수 있는 신기능 작물 품종 개발 방법이 새롭게 모색될 수 있다. 이러한 새로운 제초 방법의 하나로 제초제 내성 유전자를 작물에 도입하여 제초제 저항성 식물을 창출하는 연구들이 미국과 일본을 중심으로 이루어지고 있으며 그 성과도 크게 기대되고 있다. 제초제 저항성 식물의 개발 방법으로는 자연 상태에서 발견된 내성 식물과의 교배 육종, 세포 배양에 의한 돌연변이체의 선발, 원형질 융합 기술과 유전공학 기술에 의한 외부 유전자의 도입 등을 들 수 있는 바, 유전공학 기술에 의한 유전자의 변이 및 형질 전환체의 개발이 가장 효율적이고 성공 가능성이 높은 것으로 생각되고 있다. 실

제 acetolactate synthase의 저해제인 imidazolinone계 제초제에 대한 저항성 벼가 개발되어 시판되고 있기도 하다. 그러나 이들 광활성 제초제의 다양한 장점에도 불구하고 저항성 식물의 개발은 세계적으로 아직 미미하며 특히 DPE계 제초제의 작용이 매우 신속한 속도로 일어난다는 점과 작용 기작이 단순하지 않다는 점은 고전적인 방법에 의한 저항성 식물의 개발을 더욱 어렵게 하고 있다.

DPE계 제초제의 작용점으로 알려진 Protogen IX의 산화 반응은 식물체뿐만 아니라 포유류, 이스트, 박테리아 등 헴(heme)이나 엽록소를 필요로 하는 거의 모든 생물체에 필수적으로 존재하는 과정으로 Protox의 작용에 의하여 형성된 Proto IX는 Fe-chelatase나 Mg-chelatase가 관여하여 헴의 생합성과 엽록소의 생합성으로 분지되게 된다. 지금까지의 연구 결과에 따르면 Protox는 진핵생물체의 미토콘드리아와 엽록체의 외막 또는 원핵생물체의 세포막에 존재하며 산소나 호흡 전자 전달계의 일부를 전자 수용체로 사용하여 Protogen IX를 산화시킨다고 알려져 있다. 헴과 엽록소 생합성의 전구 물질인 포르피린은 동물과 식물체에서 필수적인 역할들을 수행하고 있으나, 박테리아와 yeast에 있어서 Protox 효소가 결합된 경우들이 각각 알려져 있으며 동물의 경우 헴의 생합성 효소군의 하나가 결합되어 생기는 포르피리아(porphyrin)와 같은 유전적 질병은 오래 전부터 알려져 있다. DPE계 광활성 제초제들은 식물체에 존재하는 Protox의 활성을 저해하여 식물체의 급격한 탈수와 탈색을 유발시켜 식물체를 고사시킴으로써 제초효과를 나타낸다. DPE계 화합물에 의하여 Protox가 저해되면 Protox의 기질인 Protogen IX가 축적되어 엽록체 밖으로 이동되고 원형질막에 도달한 후 비효소적 또는 DPE에 저항성을 나타내는 PM(plasma membrane)-Protox에 의하여 Proto IX로 산화가 일어나며 그 결과 원형질막에 축적된 Proto IX는 광에 의하여 singlet oxygen을 만들고 이 singlet oxygen이 지질과산화작용을 일으켜 식물체의 세포막을 파괴하는 것으로 알려져 있다. Protox는 보리, yeast, 생쥐, 포유류의 간과 *Desulfovibrio gigas* 등으로부터 정제된 바 있다. 일반적으로 포유류에 존재하는 Protox는 단일 폴리펩티드로 이루어져 있으며 FAD나 FMN이 조효소로 작용하고 acifluorfen과 같은 광활성 DPE계 제초제에 의하여 활성이 저해되지만 박테리아에 존재하는 Protox는 DPE계 제초제에 의하여 활성이 저해되지 않는 등 yeast나 포유류의 Protox와는 구조적으로나 기능적인 면에서 차이가 있는 것으로 판

단되고 있다.

다양한 종류의 생물체들에서 관찰되는 Prottox의 이러한 기능적 차이는 각 생물체에 존재하는 Prottox의 구조상의 차이와 그에 따른 반응 기작의 차이에서 그 근본 원인을 찾아야 할 것이다. 따라서 DPE계 화합물에 대하여 저항성을 나타낼 수 있는 원핵생물의 Prottox와 감수성을 나타내는 대표적인 진핵생물의 Prottox들에 대한 생리적, 생화학적 기능의 비교 연구가 필수적이며, Prottox 유전자 조작 기술을 개발함으로써 특정 제초제에 대한 탁월한 저항성을 지니는 신기능 식물체의 창출이 가능할 것이다. 생산된 신기능 형질전환 식물체에 대하여 환경 반응 특이성과 유전성 및 생산성 연구는 본 연구의 결과를 현장에서 유효하게 적용하기 위하여 필수적인 부분이 될 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. *Bacillus subtilis*와 벼로부터 Prottox 유전자의 클로닝, 발현 및 Prottox 효소의 반응 기작 비교 연구

- 1) Prottox 유전자의 발현
- 2) 이종 발현된 Prottox 효소의 정제 결과
- 3) Protogen IX의 산화 반응에 대한 유기 조효소 및 금속 조효소의 효과
- 4) Protogen IX 산화 반응의 특성: 비효소적 산화 반응과 효소적 산화 반응의 비교
- 5) 벼의 Prottox 유전자 확보
- 6) 벼 Prottox 유전자의 구조
- 7) His-Tag 벡터를 이용한 이종 발현 Prottox 효소의 생산
- 8) *B. subtilis* Prottox의 항체 제조
- 9) Prottox 효소의 발현 및 inclusion body의 생성
- 10) Ni-NTA column을 이용한 soluble Prottox 효소의 정제
- 11) Soluble Prottox 효소 활성에 미치는 FAD의 효과
- 12) Inclusion body의 형성
- 13) Inclusion body로부터 Prottox 효소의 추출

- 14) Seedling emergence와 mortality 측정에 의한 형질전환 벼의 oxyfluorfen 저항성
- 15) 형질 전환 벼의 T1 세대에서 DPE 저항성 검정을 위한 germination inhibition assay 방법의 개발
- 16) 자리-지정 돌연변이
- 17) Wild type과 변이 Protox 효소의 생산
- 18) Wild type과 변이 Protox 효소의 특성 비교

2. 광활성 제초제에 대한 저항성 형질전환 작물 개발

1) 담배의 형질전환

- 가. *Bacillus subtilis* genomic library로부터 Protox 유전자 분리
- 나. PCR을 통한 Protox 유전자의 증폭
- 다. Protox 유전자의 염기서열 결정
- 라. 식물 발현 벡터 제조
- 마. 담배세포의 형질전환
- 바. 담배의 형질전환 여부 확인 및 T1 종자 확보

2) 벼의 형질전환

- 가. Transit sequence의 PCR cloning 작업
- 나. pGA1611을 이용한 *B. subtilis* Protox: pGA1611 벡터 조작
- 다. *B. subtilis* Protox 유전자 형질전환용 벡터로의 삽입
- 라. 벼의 형질전환
- 마. 벼의 형질전환 여부 확인
- 바. 다수의 색소체 발현 형질전환 벼 추가육성 및 T1종자 획득
- 사. 색소체 발현 T1세대 종자의 hygromycin 저항성 유무 및 분리비 분석
- 아. 색소체 발현 T2 형질전환체의 copy수에 따른 제초제 저항성 검정

3. 광활성 제초제에 대한 형질전환 식물체의 생리, 생화학적 반응

1) Oxyfluorfen에 대한 재배종 담배의 엽기별 반응

- 2) Oxyfluorfen에 대한 야생형 담배와 형질전환 담배의 생리학적 반응 비교
- 3) Oxyfluorfen에 대한 밀의 내성 기작
- 4) Oxyfluorfen에 대한 형질전환 벼의 생리학적 반응
 - 가. CaMV 35S promoter를 이용하여 만든 형질전환 벼에 대한 oxyfluorfen의 효과
 - 나. Ubiquitin promoter를 이용하여 만든 형질전환 벼에 대한 oxyfluorfen의 효과
- 5) 형질전환 벼의 oxyfluorfen에 대한 저항성 기작
 - 가. 재배종 벼의 경우
 - 나. Ubiquitin promoter에 의해 *B. subtilis* Prottox 유전자를 세포질에 전이시킨 경우
 - 다. Ubiquitin promoter에 의해 *B. subtilis* Prottox 유전자를 plastid에 전이시킨 경우

4. 형질전환 식물의 환경 반응 특이성, 생산성 비교 연구

- 1) 형질전환 담배의 환경 반응 특이성
 - 가. 형질전환 담배의 온도 반응
 - 나. 형질전환 담배의 광량 반응
 - 다. 형질전환 담배의 수분 반응
 - 라. 형질전환 담배의 온실 조건 반응
- 2) 형질전환 벼의 환경 반응 특이성, 생산성, 유전성 비교
 - 가. 비료(N-P-K) 시용량에 따른 형질전환 벼의 생육 반응
 - 나. 건답조건에 의한 형질전환 벼의 생육반응
 - 다. 도복에 의한 형질전환 벼의 생육 반응
 - 라. 농약에 의한 형질전환 벼의 내성 반응
 - 마. 제초제와 질소의 상호작용에 의한 형질전환 벼의 성장 및 수량성
 - 바. 재배환경(재식밀도 x 질소) 변화에 따른 형질전환 벼의 성장 및 수량성
 - 사. 이앙시기별 형질전환벼의 생육 반응

아. 형질전환 벼의 유전적 안정성 평가

3) 미질 안정성

가. 쌀알의 일반 특성

나. 쌀의 일반성분

다. 쌀의 이화학적 특성

라. 호화특성

마. 밥의 텍스처

바. 관능평가에 의한 밥맛의 특성 비교

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. *Bacillus subtilis*와 벼로부터 Protox 유전자의 클로닝, 발현 및 Protox 효소의 반응 기작 비교 연구

Heme과 chlorophyll의 생합성이 분지 되는 종착점에 존재하는 Protoporphyrinogen oxidase (Protox)는 oxyfluorfen을 비롯한 많은 종류의 diphenyl ether계 제초제의 작용점이다. 제초제의 생화학적 작용기작은 plastid에 존재하는 Protox 효소가 제초제에 의하여 competitive inhibition에 의하여 활성이 저해됨으로서 기질인 Protox IX이 축적되고, 축적된 기질이 세포질을 지나서 plasma membrane에 도달하여 광활성 물질인 Proto IX으로 산화됨으로서 산소와 빛의 존재하에서 기질의 과산화를 유도함으로서 식물세포가 파괴된다고 알려져 있다.

1) *B. subtilis* Protox 반응의 특성 규명

대부분의 진핵생물체에서 유래된 Protox는 diphenyl ether계 제초제에 의하여 활성이 크게 저해 받는다. 반면에 *B. subtilis* Protox는 diphenyl ether계 제초제에 대하여 덜 민감하게 반응한다. 이러한 생물체의 종에 따른 제초제에 대한 민감도가 다른 원인을 이해하기 위하여 *B. subtilis* Protox을 대장균에서 발현시켜서 대량생산하고 정제하였으며, 효소적 성질과 그 특성을 규명하였다. *B. subtilis* Protox 효소는 FAD를 조효소로 요구하였으며, *n*-octylglucopyranoside와 같은 detergent에 의하여 활성이 증가됨을 알 수 있었다. Protox IX의 산화 반응의 속도를 기질의 농도

에 따라 분석한 결과, Protgen IX의 산화 반응은 2개의 중간체를 갖는 pre-equilibrium mechanism을 제시할 수 있었다.

2) Diphenyl ether계 제초제에 저항성을 나타내는 형질전환 식물의 생산

Diphenyl ether계 제초제에 저항성을 나타내는 형질전환 식물을 생산하기 위하여 다른 세부과제와 협력하여 *B. subtilis* Protox 유전자를 담배와 벼에 형질전환 하였다. 얻어진 형질전환 식물들은 oxyfluorfen에 대하여 높은 저항성을 나타냈다.

3) 벼에서 oxyfluorfen 저항성을 판별하는 효율적인 방법의 개발

Diphenyl ether계 제초제에 대한 저항성을 판별하기 위한 현존하는 방법으로 leaf disc assay 방법을 들 수 있다. 그러나 이 방법은 대상 식물체를 파괴하여야하고, 식물체가 상당히 자란 후에 가능하다. 본 연구에서는 *B. subtilis* Protox 유전자를 도입시킨 형질전환 벼를 재료로하여 종자의 발아 속도와 유묘의 mortality를 분석함으로써 oxyfluorfen에 저항성인 개체를 편리하게 선별할 수 있는 방법을 개발하였다. 유묘의 mortality는 지질의 과산화도와 잘 일치하였다. 따라서, 본 연구에서 개발된 방법은 oxyfluorfen에 저항성인 식물 개체를 선별하기 위하여 편리하고 신속하게 사용될 수 있을 것이다.

4) *B. subtilis* Protox의 V311M 변이는 oxyfluorfen에 대한 저항성을 증가시킨다.

B. subtilis Protox의 Val-311을 Met으로 변이 시킨 후, V311M 변이 유전자를 대장균에서 발현시켜, V311M 변이 Protx 효소를 생산하고, 정제한 후, 효소적 성질과 촉매 기작을 wild type 과 비교 분석하였다. 그 결과 V311M 변이 효소의 Km, kcat, kcat/Km 값은 wild-type과 거의 동일하였으나, Ki 값은 wild-type에 비하여 1.6 배 증가하였다. 이러한 결과는 V311M 변이가 효소의 구조나 촉매 기작은 변화시키지 않으면서, oxyfluorfen 제초제의 결합은 억제됨을 시사한다. 따라서 oxyfluorfen 저항성 작물의 육성에서 V311M 변이 Protox 유전자는 wild type의 Protx 유전자보다 우수하다는 것을 입증하고 있다.

2. 광활성 제초제에 대한 저항성 형질전환 작물 개발

3가지 유형의 벡터조합을 이용하여 형질전환을 시도하였으며, ubiquitin promoter를 사용하여 지속적인 발현을 유도하였다. 균주는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 이용하였고, hygromycin을 이용하여 형질이 전환된 callus와 재 분화배지에서의 형질전환 개체들을 선발하였다. 평균적으로 hygromycin 선발배지에서 10-15% calli들이 살아남았으며, 그 중의 1-5%만이 재 분화되어 뿌리를 유도하여 수확할 때까지 생육시켰다. 다음세대에서의 유전자의 존재유무를 알아보기 위한 DNA blot, RNA blot, 그리고, Western blot등의 분석결과, 유전자는 다음세대로 전이가 되고 있었으며 일부 계통에서는 세대가 진전되면서 유전자의 일부를 소실하는 경우도 있었다. leaf disk assay를 통하여 본 oxyfluorfen 저항성 검정에서 비형질전환체인 wild type은 1 μ M에서부터 엽록소 합성의 저해를 받았으며, 3 μ M이상에서는 회복하지 못할 정도로 심각한 탈색을 나타내 제초제에 의해 피해를 입었음을 알 수 있었다. 또한, TC에서도 wild type과 동일한 경향을 나타내어 본 실험에 사용하였던 vector 자체로는 제초제에 대한 저항성을 갖지 않는 것으로 판명되었다. 반면에 *B. subtilis* Protocx 유전자를 도입하였던 line들은 10 μ M에서도 탈색이 거의 일어나지 않는 것으로 보여 oxyfluorfen에 어느 정도 저항할 수 있는 형질을 가지게 된 것을 확인하였다. 또한 유전자의 삽입개수는 1-3개 정도로 다양하였지만 제초제를 처리해 본 결과, 유전자의 개수가 제초제에 대한 저항성을 증가시키지는 않는다는 것도 판명할 수 있었다. 참고로 T₁종자를 다수 확보할 수 없었던 것은 실제 벼의 생육시기가 아니었기 때문이었을 것이므로 종자를 다수 확보하기 위해서는 callus의 재 분화시기를 조절해야만 실험재료인 충실한 후대종자를 수확할 수 있을 것으로 사료된다.

3. 광활성 제초제에 대한 형질전환 식물체의 생리, 생화학적 반응

1) Oxyfluorfen에 대한 재배종 담배의 엽기별 반응

Diphenyl ether계 제초제인 oxyfluorfen에 의해 나타나는 세포내 구성물질의 누출, 엽록소 파괴, 지질과산화작용 등 전형적인 생리적 반응을 재배종 담배를 대상으로 하여 엽령별로 조사하였다. Oxyfluorfen을 담배의 엽절편에 처리하고 암조건에서 12시간 동안 배양한 후 광조건하에서 시간별로 전해물질의 누출을 측정된 결과, 암조건하

에서는 전해물질의 누출은 일어나지 않았으나 광조건하에서 일정 기간의 lag period 를 거친 후 배양시간이 경과함에 따라 크게 증가하였다. Oxyfluorfen에 의한 전해물질의 누출은 처리 농도의 증가에 따라 증대되었으며 담배 잎에 대한 oxyfluorfen의 효과는 엽령에 따라 크게 다르게 나타나 어린 잎일수록 전해물질의 누출이 뚜렷하였으며 반응의 lag period도 단축되었다. Oxyfluorfen에 의한 담배잎의 엽록소 함량 감소와 malondialdehyde의 생성도 엽령에 따라 크게 좌우되어 엽령별로 어린 잎일수록 크게 나타났다. 이상의 결과에서와 같이 oxyfluorfen에 의해 담배 잎에 나타나는 생리적 반응이 잎의 엽령에 따라 크게 달라져 담배는 diphenyl ether계 제초제에 대한 내성기작연구에 유용한 식물 재료가 될 것으로 생각된다.

2) Oxyfluorfen에 대한 야생형 담배와 형질전환 담배의 생리학적 반응 비교

Bacillus subtilis protoporphyrinogen oxidase 유전자를 *agrobacterium*을 매개체로 이용하여 전이시킨 후 cauliflower mosaic virus 35S promoter하에서 발현케 한 형질전환 담배를 유기하였다. 이러한 형질전환 담배의 diphenyl ether계 제초제 oxyfluorfen에 대한 생리적 반응과 여러 환경 조건하에서의 성장 반응을 재배종 담배와 비교하였다. oxyfluorfen의 처리에 의해 나타나는 세포내 구성물질의 누출과 지질 과산화작용은 재배종 담배에서보다 형질전환 담배에서 더 작게 이루어졌다. 형질전환 담배의 성장을 여러 온도, 광도 및 수분 조건에서 조사한 결과, 저광도와 포화수분 조건에서의 생장이 재배종 담배에 비해 다소 저하되는 현상이 나타났을 뿐 기타 조건에서의 생장은 재배종 담배의 성장과 거의 동일하였다. 따라서 *B. subtilis* protoporphyrinogen oxidase 유전자를 전이시켜 cauliflower mosaic virus 35S promoter하에서 발현케 한 형질전환 담배는 oxyfluorfen에 대해 비교적 높은 저항성을 나타내지만 형질전환에 따른 성장 변화는 크게 일어나지 않음을 알 수 있었다. 한편 이러한 형질전환 담배의 oxyfluorfen에 대한 저항성 기작에 대해서도 논의하였다.

3) Oxyfluorfen에 대한 밀의 내성 기작

또한 밀과 보리의 내성 기작을 밝히고자 이들 성장반응, 전해물질의 누출 정도, 엽록소 함량

및 지질과산화작용의 산물인 MDA의 생성량, Protox의 활성 그리고 Proto IX의 축적량을 조사하였다. 경엽처리시의 oxyfluorfen의 I_{50} 값은 토양처리시보다 월등하게 낮았으나 밀과 보리의 I_{50} 값의 차이는 더욱 뚜렷하여 밀에 대한 I_{50} 값이 보리에 대한 값보다 약 8배 높게 나타났다. Oxyfluorfen의 처리 농도에 따른 엽 절편으로부터의 시간별 전해물질의 누출은 밀보다 보리에서 뚜렷하게 이루어졌으며 엽록소의 파괴와 MDA의 생성도 보리보다 밀에서 더 작게 이루어졌다. 또한 oxyfluorfen의 처리농도에 따라 Proto IX이 밀과 보리의 잎에 축적되었는데 축적 정도가 밀에 비해 보리에서 더욱 뚜렷하였다. 그리고 oxyfluorfen 처리에 의해 보리 etioplast의 Protox 활성이 밀에 비해 크게 저해되었다. 그러므로 oxyfluorfen에 대한 밀과 보리의 감수성 차이는 이 제초제에 의한 Protox의 저해 차이에 기인하는 것으로 생각되며 이러한 사실이 밀이 이 제초제에 비교적 내성을 나타내는 이유로 설명되리라 추측된다.

4) Oxyfluorfen에 대한 형질전환 벼의 생리학적 반응

Diphenyl ether계 제초제에 내성을 나타내는 것으로 알려진 *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase(Protox) 유전자를 세포질 및 색소체에 전이시켜 형질을 전환한 벼(*Oryza sativa* L. cv. Nakdong)의 oxyfluorfen에 대한 생리적 반응을 비교하기 위하여 본 실험을 수행하였다. Hygromycin을 첨가한 2N6 배지에서 선발한 캘루스로부터 얻어진 *B. subtilis* Protox 유전자 전이 형질전환 개체 및 T_0 , T_1 , T_3 종자를 Wagner pot에 이식하여 $30/20^{\circ}\text{C}$ 의 생장상에서 1주일 동안 순화시킨 다음 $30 \pm 5/20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ (주/야)의 온실조건에서 분얼기까지 생장시켰다. 형질전환 벼의 oxyfluorfen에 대한 생리적 반응을 형질을 전환하지 않은 벼와 비교하기 위해 엽절편 분석을 실시하였다. Oxyfluorfen에 의한 형질을 전환하지 않은 벼의 잎으로부터의 전해물질의 누출은 oxyfluorfen의 농도가 증가함에 따라 크게 증대되었다. 그러나 *B. subtilis* Protox 유전자 전이 형질전환 벼로부터의 전해물질의 누출은 재배종 벼에서보다 작게 이루어졌다. 특히 색소체에 *B. subtilis* Protox 유전자를 발현시켜 형질을 전환한 벼의 경우 oxyfluorfen에 의한 전해물질의 누출이 극히 미미하여 *B. subtilis* Protox 유전자를 세포질에 발현시킨 것보다 oxyfluorfen에 대한 더욱 뚜렷한 저항성을 나타내었다. 엽록소 함량의 감소는 oxyfluorfen의 농도가 증가함에 따라 크게 증대되었다. 그러나

B. subtilis Protox 유전자를 세포질에 발현시킨 경우나 색소체에 발현시킨 경우 모두 oxyfluorfen에 의한 엽록소 함량의 감소가 이루어지지 않았다. 지질과산화작용의 지표로 malondialdehyde(MDA) 생성량을 조사하였는데, oxyfluorfen에 의한 MDA의 생성량도 전해물질의 누출이나 엽록소의 경우에서와 마찬가지로 형질전환 벼에서 뚜렷하게 나타나지 않았으며 *B. subtilis* Protox 유전자를 세포질에 발현시킨 벼의 경우보다 색소체에 발현시킨 벼가 oxyfluorfen에 의한 MDA 생성이 더욱 작게 나타났다. Proto IX의 축적량은 무처리에서는 형질전환 벼와 형질을 전환하지 않은 벼 사이에 거의 차이가 없었으나, carfentrazone과 oxyfluorfen을 처리한 경우에는 Proto IX의 축적이 높아졌으며 형질을 전환한 벼는 형질을 전환하지 않은 벼보다 Proto IX의 축적량이 적었고, 색소체에서 발현시킨 벼가 세포질에서 발현시킨 벼보다 Proto IX의 축적량이 다소 적었다. 또한 Protox 효소의 활성은 무처리 상태에서는 형질전환벼가 형질을 전환하지 않은 벼보다 다소 활성이 높았으며, carfentrazone과 oxyfluorfen을 처리했을 경우에는 형질을 전환하지 않은 벼가 형질을 전환한 벼보다 활성 저해정도가 컸다. 따라서 *B. subtilis* Protox 유전자를 전이시켜 형질을 전환한 벼는 carfentrazone과 oxyfluorfen에 저항성을 나타내고 있음을 알 수 있었다.

5) 형질전환 벼의 oxyfluorfen에 대한 저항성 기작

한편, oxyfluorfen에 대한 형질전환벼의 저항성 기작에 있어서 세포질에 발현시킨 형질전환 벼는 색소체에서 이탈한 protoporphyrinogen IX(Protogen)은 oxyfluorfen에 내성을 나타내는 *B. subtilis* Protox에 의해 protoporphyrin IX (Proto)으로 산화되어 색소체와 미토콘드리아로 이동하여 porphyrin 생합성에 이용될 것이고 원형질막으로 이동되는 Protogen은 형질을 전환하지 않는 벼에 비해 그 양이 적을 것이므로 Proto의 감소에 의해 저항성을 나타낼 것으로 생각된다. 또한 색소체에서 발현시킨 형질전환 벼는 정상적으로 색소체에서 Protogen을 Proto로 산화시킬 수 있을 것이다. Oxyfluorfen을 처리하지 않은 경우에는 형질을 전환하지 않은 벼보다 그 Protox의 활성이 높을 것이므로 Proto가 과다하게 축적될 것이다. 그러나 porphyrin 생합성의 전구물질인 δ -aminolevulinic acid의 합성에 heme과 protochlorophyllide에 의한 feedback inhibition이 일어나 결국에는 과다한 Proto의 축적이 증지되어 정상적으로

porphyrin 생합성이 이루어지면서 저항성을 나타낼 것으로 생각된다.

4. 형질전환 식물의 환경 반응 특이성, 생산성 비교 연구

Bacillus subtilis protoporphyrinogen(Protox) 유전자를 *Agrobacterium*을 매개체로 이용하여 전이시킨 후 cauliflower mosaic virus 35S promoter하에서 발현케 한 형질전환 담배와 벼를 개발하였다. 이러한 형질전환 담배와 벼에 대하여 여러 환경조건에서의 성장, 수량성 및 미질안정성을 형질을 전환하지 않은 담배와 비교하였다. 형질전환 담배의 생장은 여러 온도, 광도 및 수분조건에서의 생장이 형질을 전환하지 않은 담배에 비해 다소 저하되는 현상이 나타났을 뿐 기타조건에서의 생장은 형질을 전환하지 않은 담배의 성장과 거의 동일하였다.

형질전환 벼의 생장을 무질소 및 질소 표준 시비량의 1/2, 1, 2배 수준에서 조사한 결과, 표준 시비량의 배량시비에서는 형질전환 벼가 형질을 전환하지 않은 벼보다 분얼수가 증가하였으나 무비구와 1/2 시비구에서는 형질전환 벼가 형질을 전환하지 않은 벼보다 분얼수가 적었다. 건담조건하에서의 형질전환벼와 형질을 전환하지 않은 벼간에 성장(초장, 엽수, 분얼수)감소는 서로 유의한 차이는 없었다. 도복처리 후 생장의 회복은 형질전환 벼가 형질을 전환하지 않은 벼에 비해 다소 빨라 형질전환 벼가 도복에 강한 것으로 생각되었다. 또한, 살충제, 살균제 및 제초제에 대한 형질전환 벼의 내성 반응은 형질을 전환하지 않은 벼와 큰 차이가 없었다. Protox 저해제인 carfentrazone과 질소비료 상호작용 연구의 결과, carfentrazone을 처리하지 않은 질소 표준 및 배량 처리에서는 파종 후 2~6주 제 형질전환 벼의 초장, 분얼수 및 수량과 수량구성 요소는 형질을 전환하지 않은 벼보다 다소 떨어졌다. 그러나 질소 표준 및 배량 처리와 carfentrazone 조합 처리에서는 무처리에 대비하여 형질을 전환하지 않은 벼가 형질전환 계통보다 벼의 성장 및 수량감소가 크게 나타났다. 재식밀도와 질소 비료 수준을 달리하여 형질전환 벼와 형질을 전환하지 않은 벼간에 성장 및 수량성을 포장조건에서 조사한 결과, 이앙 후 4주와 8주 제에 초장과 분얼수는 재식밀도와 비료수준에 관계없이 형질전환 벼와 형질을 전환하지 않은 벼간에 유의적인 차이가 없었다. 또한 벼의 수량 구성요소에 있어서도 형질전환 벼와 형질을 전환하지 않은 벼간에 차이가 없었고 수량 구성요소에 의해 산출된 수량에서도 이들 형질전환

계통과 형질을 전환하지 않은 벼간에 큰 차이가 없거나 오히려 형질전환 벼 계통에서 수량이 많았다. 이양시기별 생육반응에 있어서 형질전환벼는 형질을 전환하지 않은 벼에 비해 초장 및 분얼수에는 큰 차이가 없었으나 형질전환 control은 재배벼와 형질전환벼에 비해 분얼수가 적은 경향을 보였다. 형질전환 벼의 미질 안정성을 조사하기 위하여 쌀알의 일반특성 및 성분, 이화학적 특성, 호화특성, 밥의 텍스처, 밥맛의 특성 등을 형질을 전환하지 않은 벼와 비교하였다. 형질전환 벼와 형질을 전환하지 않은 벼간에는 이들 특성에는 큰 차이가 없어 형질전환으로 인한 미질의 변화는 없는 것으로 사료되었다. 따라서 *Bacillus subtilis* Protox 유전자를 전이시켜 cauliflower mosaic virus 35S promoter하에서 발현케 한 형질전환 담배와 벼는 Protox 저해제 제초제에 대해 비교적 높은 저항성을 나타내지만 형질전환에 따른 생장 및 수량성 변화는 크게 일어나지 않음을 알 수 있다.

SUMMARY

I. Title

Studies on the enzymes of the porphyrin biosynthetic pathway and development of herbicide-resistant crops through gene manipulation.

II. Importance of Study

The oxidation of protoporphyrinogen IX (Proto IX) to protoporphyrin IX (Proto IX) is the last common step in the biosynthesis of heme and chlorophyll. This six-electron oxidation is catalyzed by the enzyme protoporphyrinogen oxidase (Protox) *in vivo* and can readily occur nonenzymatically. A variety of diphenyl ether (DPE) compounds such as oxyfluorfen and acifluorfen can be used as effective herbicides in crop protection and it is generally accepted that Protox is the primary target of photodynamic DPE compounds, thereby Proto IX is accumulated in plastid envelope, diffused into cytosol, transported to plasma membrane, and oxidized by enzymatic or nonenzymatic process. The resulting Proto IX mediates lipid peroxidation and cellular death in the presence of molecular oxygen and light.

In plants, the target enzyme of DPE herbicides is located in the chloroplast envelope. Three enzymes from prokaryotes have been cloned, sequenced, expressed, and partially characterized. Although a number of biochemical properties of the enzyme from *Bacillus subtilis* are similar to eukaryotic enzymes in terms of an electron acceptor and a cofactor, this enzyme is resistant to inhibition by DPE herbicides which are powerful inhibitor of

eukaryotic enzyme. Therefore, the enzyme from *B. subtilis* seems to be an ideal choice to study detailed herbicidal resistant mechanism and to develop herbicide resistant transgenic plants.

III. Contents and Range of Study

1. Cloning and expression of protoporphyrinogen oxidase from *Bacillus subtilis* and rice, and mechanistic studies of protoporphyrinogen oxidase

Protoporphyrinogen oxidase (Protox), the last common enzyme in the biosynthesis of heme and chlorophyll, is the molecular target of a large number of diphenyl ether herbicides. The biochemical basis for the herbicidal mechanism is the competitive inhibition of plastid Protox, whereby protoporphyrinogen IX (Proto IX), the substrate of the enzyme, is accumulated in the plastid envelope, diffused into the cytosol, and transported to the plasma membrane, where it is rapidly oxidized by to Protoporphyrin IX (Proto IX) by a herbicide-insensitive peroxidase-like enzymes and partly by its autooxidation. resulting Proto IX causes photodynamic membrane lipid peroxidation and ultimate cellular death in the presence of molecular oxygen and light.

1) Characterization of *B. subtilis* Protox

All eukaryotic Protox characterized to date are severely inhibited by diphenyl ether compound. In contrast, *B. subtilis* Protox is poorly inhibited by diphenyl ether herbicides. To better understand the basis of this insensitivity, the enzyme was overexpressed as a soluble protein in *E. coli*,

purified and characterized. The mechanism of oxidation of *B. subtilis* Protogen IX was studied and kinetic parameters were determined for Protogen IX. The enzyme required flavin adenine dinucleotide as a cofactor and its activity was enhanced by 1 mM *n*-octylglucopyranoside. The nonenzymatic oxidation rate was dependent on the concentration of protoporphyrinogen IX, suggesting that the reaction involves a pre-equilibrium step followed by a rate-limiting step.

2) Generation of transgenic plants resistant to diphenyl ether herbicides

In an effort to develop the transgenic plants resistant to diphenyl ether herbicides, the *B. subtilis* Prottox gene was introduced into tobacco and rice plants. Resulting transgenic plants showed large increase of resistance to the oxyfluorfen.

3) Development of efficient method to assess oxyfluorfen resistance of rice plants

The biochemical method currently available to assess the response of plants to diphenyl ether herbicides is the leaf disc assay. This method requires destructive sampling and is applicable only when individual plants reach a certain stage of growth. In this work, the rate of seed germination and the mortality of seedlings were examined after exposure of rice seeds to oxyfluorfen and these parameters were found to be efficient and convenient to assess resistance of rice plants to oxyfluorfen at an early stage of growth. The mortality was well correlated with lipid peroxidation as an assessment of oxyfluorfen resistance. Thus, this approach has potential as an efficient and rapid screening method which can differentiate between transgenic lines that are resistant or sensitive to oxyfluorfen.

4) Mutation of Val-311 to M-311 of *B. subtilis* Prottox increases the resistance

to oxyfluorfen.

V311 of *B. subtilis* Protox was mutated to Met and resulting V311M mutant of *B. subtilis* Protox was expressed in *E. coli*, purified to the homogeneity, and its enzymatic properties were characterized its catalytic behavior was compared to the wild type. As shown in Table 1, little changes of kinetic constants of (K_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m) in V311M mutant Protox. However, K_i increased to 1.6 times compared to the wild-type. This result indicated that V311M mutation successfully increased the resistance to oxyfluorfen without changes in the enzyme structure and catalytic mechanism. Therefore, V311M mutant of *B. subtilis* Protox would be the better choice than the wild type for generating transgenic plants resistant to diphenyl ether herbicides.

2. Development of transgenic rice plants expressing resistance to the diphenyl ether herbicide, oxyfluorfen

Three gene constructs (pGA1611 vector only, pGA1611:C and pGA1611:P) were prepared using conventional molecular biology techniques and employed for further transformation. These gene constructs were subcloned into a binary vector pGA1611 harboring a constitutive ubiquitin promoter which was known to be highly expressed in rice and a hygromycin phosphotransferase as a selection marker and transformed into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Transgenic rice plants resistant to diphenyl ether herbicide oxyfluorfen were generated via selection of hygromycin-resistant calli after *Agrobacterium*-mediated transformation. On average, 10-15% calli were survived the selection medium containing $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ hygromycin. After transferring onto regeneration medium, selected calli were regenerated into shoots at a rate of 1-5%. The integration, expression, and inheritance of the transgene were further investigated in T_0 , T_1 , and T_2 generations by DNA blot, RNA blot, Western blot, and other biochemical analyses. Western blot analysis using a polyclonal antibody raised

against the *B. subtilis* Prottox with T₁ transgenic plants showed much higher expressions in the plastid targeted plants than in the cytoplasm expressed plants. Both cytoplasm and plastid lines expressing the *B. subtilis* Prottox in T₁ and T₂ generation were resistant to the herbicide judged from the results of seed germination and leaf disk assay.

3. Physiological and biochemical responses of transgenic plants to diphenyl ether herbicides

1) Physiological responses of tobacco leaves of different age to DPE herbicide oxyfluorfen

Responses of tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) leaves of different age to DPE herbicide oxyfluorfen were evaluated with respect to cellular leakage, chlorophyll loss, and membrane lipid peroxidation. When tobacco leaves of different age were incubated under light condition at 25°C following 12 h dark incubation, significant electrolyte leakage from the treated tissues into the bathing medium occurred. The change of electrolyte leakage was proportional to the oxyfluorfen concentration and the duration of light exposure to the tissues. Electrolyte leakage from the tissues treated with oxyfluorfen was highly dependent on the leaf age. From the tissues of younger age, more electrolyte leakage occurred and lag period was greatly reduced. Chlorophyll loss and membrane lipid peroxidation, as measured by malondialdehyde (MDA) production, caused by oxyfluorfen treatment were also dependent on the age of treated leaf tissues. In conclusion, physiological responses of tobacco leaves to oxyfluorfen greatly varied with the age of treated tissues, and thus tobacco plants could be used as appropriate materials for studying the mechanism of tolerance to DPE herbicides.

2) Physiology and growth of transgenic tobacco plants containing *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase gene in response to oxyfluorfen treatment

The transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanti) plants containing *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase gene with cauliflower mosaic virus 35S promoter have been generated by using *Agrobacterium*-mediated gene transformation. The nontransgenic and the transgenic plants were compared with respect to responses to diphenyl ether herbicide oxyfluorfen and under various environmental conditions. Both cellular leakage and lipid peroxidation caused by oxyfluorfen were found to be less in the transgenic than in the nontransgenic plants. Growth responses of the transgenic plants under various temperature, light, and water conditions were almost the same as those of the nontransgenic plants, although the transgenic plants exhibited slightly more retarded growth under low light or saturated water condition. These results revealed that the transgenic tobacco plants containing *B. subtilis* protoporphyrinogen oxidase gene under cauliflower mosaic virus 35S promoter were relatively resistant to oxyfluorfen and exhibited normal growth pattern. Possible mechanism of resistance to oxyfluorfen in the transgenic plants is also discussed.

3) Differential susceptibilities of wheat and barley to oxyfluorfen

Wheat is known to be relatively tolerant to DPE herbicides. Growth and physiological responses of wheat to DPE herbicide oxyfluorfen were examined in comparison with those of oxyfluorfen susceptible barley. Compared to barley, wheat was significantly less susceptible to the herbicide with preemergence and postemergence treatments. The differential susceptibilities of wheat and barley to the herbicide were more apparent with postemergence than with preemergence treatment. The effects of the herbicide on causing cellular leakage, chlorophyll loss, and lipid peroxidation were much lower in wheat than in

barley leaves, Proto IX accumulated in both wheat and barley leaves treated with oxyfluorfen, in a concentration-dependent manner. However, the magnitude of the Proto IX accumulation was much lower in wheat than in barley leaves treated with oxyfluorfen at a concentration of higher than 0.33 μM . Protox from wheat leaves was found to be less susceptible to oxyfluorfen than that from barley leaves. The I_{50} concentration of oxyfluorfen on Protox activity were approximately 0.2 and 0.06 μM for wheat and barley etioplasts, respectively. Whereas the inhibition of Protox in barley etioplasts increased with increasing concentration of oxyfluorfen, Protox in wheat etioplasts was not further inhibited beyond 0.33 μM oxyfluorfen concentrations. Our results suggest that inhibition of Protox by the herbicide, and thereby wheat is relatively tolerant to the herbicide.

4) Generation of transgenic rice plants containing *B. subtilis* Protox gene and their physiology and growth in response to oxyfluorfen

Protoporphyrinogen oxidase (Protox) is the target enzyme for diphenyl ether (DPE) herbicides. Transgenic rice plants expressing a *Bacillus subtilis* Protox gene, which is known to resistant to DPE herbicides, in the cytosol or plastid were compared with respect to physiological responses to DPE herbicide oxyfluorfen. The transgenic rice plants expressing a *B. subtilis* from the calli which were on the medium containing hygromycin were transplanted to Wagner pots. Following the acclimation of the plants in a growth chamber at 25/20°C, day/night temperature with a 14 h photoperiod for 7 days, they were grown in a greenhouse at tillering stage. Cellular leakage from the nontransgenic rice plants began to increase depending on the concentration of the herbicide. However, cellular leakage from the transgenic rice plants expressing a *B. subtilis* Protox gene was lower than the nontransgenic rice plants. Especially, transgenic rice plants expressed in the plastid exhibited higher degree of

resistance than expressed in the cytosol to oxyfluorfen. Chlorophyll loss of the nontransgenic rice plants appeared to increase depending on the concentration of oxyfluorfen. However, such destruction of chlorophyll caused by oxyfluorfen was not considerable in the transgenic rice plants expressed in the cytosol or in those expressed in the plastid. Like cellular leakage and chlorophyll loss, no lipid peroxidation estimated by malondialdehyde (MDA) production appeared clearly in the transgenic rice plants. The transgenic rice plants expressed in the plastid exhibited much lower level of MDA production than those expressed in the cytosol in response to oxyfluorfen. protoporphyrin accumulation was lower the transgenic rice plants expressing a *B. subtilis* Protox gene than the nontransgenic rice plants. Expecially, transgenic rice plants expressed in the plastid exhibited lower protoporphyrin contents than expressed in the cytosol to carfentrazone and oxyfluorfen. Also, Protox activity inhibition was less the transgenic rice plants expressing a *B. subtilis* Protox gene than the nontransgenic rice plants. These results indicate that the transgenic rice plants expressing a *B. subtilis* Protox gene are resistant to carfentrazone and oxyfluorfen and the transgenic rice plants expressed in the plastid exhibit higher degree of resistance to Protox inhibitor herbicides than those expressed in the cytosol.

5) Mechanism of resistance to oxyfluorfen of transgenic rice plants

In transgenic rice plants expressed in the cytosol, before protoporphyrinogen IX (Protox) is transported to the plasma membrane, it could be oxidized to protoporphyrin IX (Proto) by the oxyfluorfen-resistant *B. subtilis* Protox in the cytosol. Since Proto is hydrophobic, it could reenter into the plastid and the mitochondrion from the cytosol, and then be used to porphyrin synthesis. Proto could also be partitioned into the plasma membrane, but Proto accumulation could be much alleviated. The transgenic rice plants expressed in

the cytosol could be resistant by reduced Proto accumulation into the plasma membrane. In the transgenic rice plants expressed in the plastid, the *B. subtilis* Protox will oxidize Protogen to Proto in the plastid membrane. However, *B. subtilis* Protox expressed in the plastid could oxidize Protogen to Proto presumably at higher rate than plastid Protox in the absence of oxyfluorfen. As a result, intermediate of biosynthesis of heme and chlorophyll beyond Proto will be accumulated in the plastid and act as photosensitizers. However, this phenomenon could soon be overcome by feedback inhibition of δ -aminolevulinic acid synthesis by heme and protochlorophyllide. Thus, the transgenic rice plants expressed in the plastid will be resistant to oxyfluorfen and accomplish normally biosynthesis of heme and chlorophyll.

4. Comparative studies of specific responses of environmental stress and productivity in transgenic rice plants

The transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) and rice (*Oryza sativa* cv. Nakdong) plants containing *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase (Protox) gene with cauliflower mosaic virus 35S promoter have recently been generated by using Agrobacterium-mediated gene transformation. The nontransgenic and the transgenic tobacco and rice plants were compared with respect to growth responses and rice yield under various environmental conditions and quality of rice grains.

Growth responses of the transgenic tobacco plants under various temperature, light and water conditions were almost the same as those of the nontransgenic plants, although the transgenic plants exhibited slightly more retarded growth under low light or saturated water condition.

Number of tiller of transgenic rice plants under the twice as much as recommended nitrogen (N) fertilizer was increased compared with the nontransgenic rice plants. On the other hand, number of tiller of transgenic

rice plants under no N fertilization and the half of recommended N fertilizer was lesser than in the nontransgenic rice plants. There were no significantly growth (plant height, number of tiller and leaves) difference between transgenic and nontransgenic rice plants under drought condition. Recovery of growth in the transgenic rice plants after loading was more rapid than in the nontransgenic rice plants. Thus transgenic rice plants thought be tolerant to loading condition. The transgenic and nontransgenic rice plants exhibited similar growth responses, in terms of plant height, number of tiller and leaves, to insecticides, fungicides, and herbicide. Plant height and number of tiller at two to six weeks after seeding, and yield components of transgenic rice plants under recommended N fertilizer and the twice as much as recommended N fertilizer without Proxox inhibitor, carfentrazone application in the 1/5000a pot were slightly reduced compared with the nontransgenic rice plants. However, the nontransgenic rice plants under recommended N fertilizer and the twice as much as recommended N fertilizer with cafentrazone application in the pot exhibited lower growth rate and yield than in the transgenic rice plants compared with each untreated control. The nontransgenic and the transgenic rice plants were compared with respect to growth responses, yield components, and yield under different planting density and levels of N fertilizer in the field. Plant height and number of tiller at 4 and 8 weeks after transplanting and yield components, and yield of the transgenic rice plants were almost the same as those of the nontransgenic rice plants under different planting density and levels of N fertilizer in the field. The nontransgenic and transgenic rice grain were compared with respect to quality of rice grain including morphology, color values, total starch, proximate compositions, phytochemical properties, pasting characteristics, textural properties, moisture contents, and sensory characteristics. The quality of the transgenic rice grain based on above characteristics was almost the same as those of the nontransgenic rice grain.

These results revealed that the transgenic tobacco and rice plants containing *B. subtilis* Protox gene under cauliflower mosaic virus 35S promoter were relatively resistant to Protox inhibitor herbicides and exhibited normal growth and yield.

CONTENTS

SUMMARY	15
CONTENTS	26
Chapter 1. Introduction	41
Section 1. Signification of study	41
Section 2. Status of study in Korea and other countries	44
Section 3. Objectives and contents of study	45
Chapter 2. Cloning and expression of protoporphyrinogen oxidase from <i>Bacillus subtilis</i> and rice, and mechanistic studies of protoporphyrinogen oxidase	47
Section 1. Introduction	47
Section 2. Materials and methods	47
1. Heterologous expression of <i>B. subtilis</i> <i>Protox</i> gene and cloning of rice <i>Protox</i> gene	48
a. Expression of <i>Protox</i> gene	48
b. Purification of heterologously expressed <i>Protox</i> enzyme	48
c. Assay of <i>Protox</i> activity	49
2. Cloning of <i>Protox</i> gene from rice	50
a. Isolation of <i>Protox</i> gene from rice	50
b. DNA sequence of <i>Protox</i> gene	51
c. Cloning of <i>Protox</i> gene from rice	51
3. Production of heterologously expressed <i>Protox</i> enzyme by His-Tag vector	51
4. Production of <i>B. subtilis</i> <i>Protox</i>	51
5. Expression of <i>Protox</i> enzyme	51
6. Purification of soluble <i>Protox</i> enzyme by Ni-NTA column	52
7. Extraction of <i>Protox</i> enzyme from the inclusion body	52
8. Evaluation of oxyfluorfen resistance of transgenic rice by seedling emergence and mortality measurements	52
9. Site-directed mutagenesis	52

10. Heterologous expression of wild type and mutant Prottox gene	53
11. Purification of wild type and mutant Prottox enzyme	53
12. Prottox assay by UV and fluorescenc	54
13. Inhibition of Prottox activity by oxyfluorfen	54
Section 3. Results and discussion	54
1. Expression of Prottox gene	54
2. Purification of heterologously expressed Prottox	54
3. Effect of organic cofactor and metal ions in the oxidation of Protogen IX	57
a. Effect of organic cofactor Prottox	57
b. Effect of metal ions in the Autooxidation	57
4. Chracterization of Protogen IX oxidation: Comarison of enzymatic and nonenzymatic oxidation	58
5. Cloning of rice Prottox gene	60
6. Structure of rice Prottox gene	60
7. Production of Prottox enzyme using His-tag vector and preparation of antibody	61
8. Production of <i>B. subtilis</i> Prottox	63
9. Expression of Prottox enzyme and formation of inclusion body	63
10. Purification of soluble Prottox enzyme by Ni-NTA column	64
11. Effect of FAD on the activity of soluble Prottox	65
12. Formation of Inclusion body	65
13. Extraction of Prottox enzyme from inclusion body	65
14. Evaluation of oxyfluorfen resistance by seedling emergence and mortality measurements in transgenic rice	67
15. Development of germination inhibition assay method for DPE resistance in T1 generation of trangenic rice	68
16. Site-directed mutagenesis	70
17. Production of wild type and mutant Prottox enzyme	72
18. Comparative studies of wild type and mutant Prottox enzyme	81
Section 4. Summary of results	87
Section 5. References	90
Chapter 3. Development of transgenic rice plants expressing resistance to the diphenyl ether herbicide, oxyfluorfen	95

Section 1. Introduction	95
Section 2. Materials and methods	96
1. Isolation of Prottox gene from <i>B. subtilis</i> genomic library	96
a. Isolation of phage DNA from genomic library	96
b. Amplification of Prottox gene	97
c. Sequencing of Prottox gene	97
2. Transformation of tobacco	97
a. Cloning of expression vector	97
b. Transformation of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404 and selection of transformant	97
c. Transformation of tobacco cell	98
d. Transgene analysis and seed harvest	98
3. Transformation of rice	98
a. Rice expression vector	98
b. Vector construction	98
c. Transformation of <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	99
d. Transformation of rice mediated by <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	99
e. Regeneration and growth in a greenhouse	99
4. Molecular analysis of transformant	99
a. Southern blot analysis	99
b. Northern blot analysis	100
c. Western blot analysis	100
5. Assay of herbicide-resistant trait	101
a. Treatment at Preemergence	101
b. Treatment at Postemergence	101
6. Southern analysis of other transgenic lines	101
7. Segregation of T ₁ seeds	101
Section 3. Results and discussion	102
1. Transformation of tobacco	102
a. Isolation of Prottox gene from <i>B. subtilis</i> genomic library	102
b. Amplification of Prottox gene	102
c. Sequencing of Prottox gene	103
d. Construction of expression vector	104
1) Cloning of expression vector	104
2) Transformation of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404 and selection	

of transformant	104
e. Transformation of tobacco cell	107
f. Transgene analysis and seed harvest	108
1) PCR analysis	108
2) Northern blot analysis	108
3) Harvest of T ₁ seeds	109
2. Transformation of rice	109
a. Cloning of transit sequence from tobacco Protoc	109
b. Vector construction	110
c. Transformation of <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	111
d. Transformation of rice	112
1) Culture of scutellum-derived rice callus	112
2) Activation of callus	112
3) Transformation of rice mediated by <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	112
4) Growth of transformants in a pot	114
e. Molecular-based transgene analysis	115
1) Southern blot analysis	115
2) Northern blot analysis	119
3) Western blot analysis	122
f. Segregation of T ₁ seeds	123
g. Assay of herbicide-resistant trait in the oxyfluorfen-concluded medium	125
h. Assay of herbicide-resistant trait by having copy numbers	126
Section 4. Summary of results	130
Section 5. References	131
Chapter 4. Physiological and biochemical responses of transgenic plants to diphenyl ether herbicides	133
Section 1. Introduction	133
Section 2. Materials and methods	137
1. Plant materials	138
2. Growth response of the transgenic and nontransgenic rice plants to Protoc inhibitor herbicides	138
3. Cellular leakage	139
4. Chlorophyll destruction	139

5. Lipid peroxidation	141
6. Photosynthesis measurement	141
7. Chlorophyll fluorescence	142
8. Proto IX accumulation	142
9. Protox activity	142
10. Antioxidant enzyme activity	142
Section 3. Results and discussion	143
1. Responses of tobacco leaves of different age to oxyfluorfen	143
2. Comparison of physiological responses of wild type tobacco and transgenic tobacco to oxyfluorfen	149
3. Mechanism of tolerance to oxyfluorfen in wheat	151
4. Physiological responses of transgenic rice plants to oxyfluorfen	157
a. Effects of transgenic rice plants under the CaMV 35S promoter to oxyfluorfen	157
b. Effects of transgenic rice plants under the Ubiquitin promoter to oxyfluorfen	158
1) T0 generation	158
2) T1 and T2 generation	159
3) T3 generation	166
5. Proposed mechanism of resistance to oxyfluorfen in transgenic plants	178
a. Proposed mechanism of resistance to oxyfluorfen in nontransgenic plants	178
b. Proposed mechanism of resistance to oxyfluorfen in transgenic plants having <i>B. subtilis</i> Protox in the cytosol	178
c. Proposed mechanism of resistance to oxyfluorfen in transgenic plants having <i>B. subtilis</i> Protox in the plastid	179
Section 4. Summary of results	183
Section 5. References	187
Chapter 5. Comparative studies of specific responses of environmental stress and productivity in transgenic rice plants	191
Section 1. Introduction	191
Section 2. Materials and methods	191
1. Responses of transgenic tobacco plants under temperature, light and	

water conditions	191
2. Comparative studies of specific responses of environmental stress and productivity in transgenic rice plants	192
a. Growth responses of transgenic rice plants by nitrogen fertilizer	192
b. Differential tolerance of transgenic rice plants by water and loading conditions	193
c. Differential tolerance of transgenic rice plants by pesticide	193
d. Effects of interaction of herbicide and nitrogen (pot experiment)	193
e. Growth and yield of transgenic rice plants under plantsing density and nitrogen	194
f. Growth of transgenic rice plants under transplanting date	194
g. Evaluation of heritable stability of transgenic plants	194
h. Stability of rice grain	195
1) General characteristics of rice grain	195
2) Production of rice flours	195
3) Characteristics of rice flours	195
4) Characteristics of starch	198
5) Textural properties of cooked rice	200
Section 3. Results and discussion	203
1. Specific responses of environmental stress of transgenic tobacco plants	203
a. Responses of transgenic tobacco plants under temperature	203
b. Responses of transgenic tobacco plants under light condition	203
c. Responses of transgenic tobacco plants under water condition	203
d. Responses of transgenic tobacco plants under greenhouse condition	206
2. Comparative studies of specific responses of environmental stress and productivity in transgenic rice plants	207
a. Growth responses of transgenic rice plants by nitrogen fertilizer	207
b. Growth responses of transgenic rice plants by drought condition	211
c. Growth responses of transgenic rice plants by lodging	213
d. Differential tolerance of transgenic rice plants by pesticide	216
e. Effects of interaction of herbicide and nitrogen (pot experiment)	219
f. Growth and yield of transgenic rice plants under planting density	

and nitrogen	225
g. Growth of transgenic rice plants under transplanting date	231
h. Evaluation of heritable stability of transgenic plants	231
i. Stability of rice grain	232
1) Characteristics of rice grain	232
2) General components of rice flours	233
3) Physicochemical properties of rice flours	236
4) Pasting characteristics of rice flours	238
5) Textural properties of cooked rice	240
6) Characteristics of cooked rice by sensory measurement	241
Section 4. Summary of results	243
Section 5. References	245
Section 6. Research results	250

목 차

요 약 문	2
목 차	33
제 1 장 서 론	41
제 1 절 연구 개발의 필요성	41
제 2 절 국내외 기술 개발 현황	44
1) 본 연구팀에 의한 지금까지의 연구 개발 실적	44
2) 국내외 타 연구기관의 연구 내용	45
제 3 절 연구 개발 목표 및 내용	45
제 2 장 <i>Bacillus subtilis</i> 와 베토부터 Prottox 유전자의 클로닝, 발현 및 Prottox 효소의 반응 기작 비교 연구	47
제 1 절 서 설	47
제 2 절 연구 수행 방법	47
1. <i>B. subtilis</i> 와 베토 Prottox 유전자의 이중 발현과 정제	48
가. Prottox 유전자의 발현	48
나. 이중 발현된 Prottox 효소 정제	48
다. Prottox의 역가 측정	49
2. 베토부터 Prottox 유전자의 클로닝	50
가. 베토부터 Prottox 유전자의 분리	50
나. Prottox 유전자들의 DNA sequence 결정 및 분석	51
다. 베토에서 Prottox 유전자의 클로닝, genomic library screening	51
3. His-Tag 벡터를 이용한 이중 발현 Prottox 효소의 생산	51
4. <i>B. subtilis</i> Prottox의 항체 제조	51
5. Prottox 효소의 발현	51
6. Ni-NTA column을 이용한 soluble Prottox 효소의 정제	52

7. Inclusion body로부터 Prottox 효소의 추출	52
8. Seedling emergence와 mortality 측정에 의한 형질전환 벼의 oxyfluorfen 저항성 검정	52
9. 자리-지정 돌연변이	52
10. Wild type 과 변이 Prottox 효소의 이종발현	53
11. Wild type 과 변이 Prottox의 정제	53
12. Prottox 활성의 Assay	54
13. oxyfluorfen에 의한 Prtox 활성의 억제	54
제 3 절 연구수행 결과 및 고찰	54
1. Prottox 유전자의 발현	54
2. 이종 발현된 Prottox 효소의 정제 결과	54
3. Protogen IX의 산화 반응에 대한 유기 조효소 및 금속 조효소의 효과	57
가. Prottox 활성에 대한 유기 조효소의 효과	57
나. Autooxidation에 대한 금속 조효소의 효과	57
4. Protogen IX 산화 반응의 특성: 비효소적 산화 반응과 효소적 산화 반응의 비교	58
5. 벼의 Prottox 유전자 확보	60
6. 벼 Prottox 유전자의 구조	60
7. His-Tag 벡터를 이용한 이종 발현 Prottox 효소의 생산	61
8. <i>B. subtilis</i> Prottox의 항체 제조	63
9. Prottox 효소의 발현 및 inclusion body의 생성	63
10. Ni-NTA column을 이용한 soluble Prottox 효소의 정제	64
11. Soluble Prottox 효소 활성에 미치는 FAD의 효과	65
12. Inclusion body의 형성	65
13. Inclusion body로부터 Prottox 효소의 추출	65
14. Seedling emergence와 mortality 측정에 의한 형질전환 벼의 oxyfluorfen 저항성	67
15. 형질 전환 벼의 T1 세대에서 DPE 저항성 검정을 위한 germination	

inhibition assay 방법의 개발	68
16. 자리-지정 돌연변이	70
17. Wild type과 변이 Protoc 효소의 생산	72
18. Wild type과 변이 Protoc 효소의 특성 비교	81
제 4 절 결과요약	87
1) <i>B. subtilis</i> Protoc 반응의 특성 규명	87
2) Diphenyl ether계 제초제에 저항성을 나타내는 형질전환 식물의 생산	87
3) 벼에서 oxyfluorefn 저항성을 판별하는 효율적인 방법의 개발	87
4) <i>B. subtilis</i> Protoc의 V311M 변이는 oxyfluorfen에 대한 저항성을 증가 시킨다.	89
제 5 절 참고문헌	90
제 3 장 광활성 제초제에 대한 저항성 형질전환 작물 개발	95
제 1 절 서 설	95
제 2 절 연구 수행 방법	96
1. <i>B. subtilis</i> genomic library로부터 Protoc 유전자 분리	96
가. Genomic library로부터 phage DNA 분리	96
나. PCR을 통한 Protoc 유전자의 증폭	97
다. Protoc 유전자의 염기서열 결정	97
2. 담배의 형질전환	97
가. 식물 발현 벡터 클로닝	97
나. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404의 transformation 및 형질전환체의 선별	97
다. 담배 세포의 형질전환	98
라. 형질전환 식물체의 확인 및 T1 종자 확보	98
3. 벼의 형질전환	98
가. 식물 발현 벡터 선정 및 특성	98
나. pGA1611을 이용한 <i>B. subtilis</i> Protoc: pGA1611 벡터 조작	98

다. <i>B. subtilis</i> Protox: pGA1611 벡터의 <i>Agrobacterium</i> 으로 형질전환	99
라. <i>Agrobacterium</i> 매개 방법에 의한 벼의 형질전환	99
마. 재 분화된 형질전환 벼의 재배	99
4. 형질전환체의 분자유전학적 분석	99
가. 형질전환체의 Southern 분석	99
나. 형질전환체의 Northern 분석	100
다. 형질전환체의 Western 분석	100
5. 형질전환체의 Oxyfluorfen 저항성 검정	101
가. Preemergence treatment 검정	101
나. Postemergence treatment 검정	101
6. 형질전환 계통의 확보	101
7. T1 종자의 hygromycin 분리 비율 측정	101
제 3 절 연구결과 및 고찰	102
1. 담배의 형질전환	102
가. <i>Bacillus subtilis</i> genomic library로부터 Protox 유전자 분리	102
나. PCR을 통한 Protox 유전자의 증폭	102
다. Protox 유전자의 염기서열 결정	103
라. 식물 발현 벡터 제조	104
1) 식물발현 벡터 클로닝	104
2) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404의 transformation 및 transformant의 선별	104
마. 담배세포의 형질전환	107
바. 담배의 형질전환 여부 확인 및 T1 종자 확보	108
1) PCR 분석	108
2) Northern 분석	108
3) T1 종자 확보	109
2. 벼의 형질전환	109
가. Transit sequence의 PCR cloning 작업	109

나. pGA1611을 이용한 <i>B. subtilis</i> Protox: pGA1611 벡터 조작	110
다. <i>B. subtilis</i> Protox 유전자 형질전환용 벡터로의 삽입	111
라. 벼의 형질전환	112
1) 벼의 배반에서 유래한 캘러스 배양	112
2) 캘러스의 활성화	112
3) <i>Agrobacterium</i> 매개에 의한 형질전환	112
4) 재 분화된 형질전환 벼의 재배	114
마. 벼의 형질전환 여부 확인	115
1) Southern blot analysis	115
2) Northern blot analysis	119
3) Western blot analysis	122
바. T1세대에서의 hygromycin 저항성 개체의 분리 비율 분석	123
1) 다수의 색소체 발현 형질전환 벼 추가육성 및 T1종자 획득	125
2) 색소체 발현 T1세대 종자의 hygromycin 저항성 유무 및 분리비 분석	105
사. Oxyfluorfen 저항성 검정	125
아. 색소체 발현 T2 형질전환체의 copy수에 따른 제초제 저항성 검정	126
제 4 절 결과요약	130
제 5 절 참고문헌	131
제 4 장 광활성 제초제에 대한 형질전환 식물체의 생리, 생화학적 반응	133
제 1 절 서 설	133
제 2 절 연구 수행 방법	137
1. 식물재료	138
2. Protox 저해형 제초제에 대한 형질전환 벼와 재배종의 성장 반응	138
3. 세포내 구성물질의 누출	139
4. 엽록소 파괴	139
5. 세포막 지질과산화작용	141
6. 광합성 측정	141

7. 엽록소 형광	142
8. Proto IX의 측정	142
9. Protox 활성 측정	142
10. 항산화효소 활성 측정	142
제 3 절 연구 결과 및 고찰	143
1. Oxyfluorfen에 대한 재배종 담배의 엽기별 반응	143
2. Oxyfluorfen에 대한 야생형 담배와 형질전환 담배의 생리학적 반응 비교	149
3. Oxyfluorfen에 대한 밀의 내성 기작	151
4. Oxyfluorfen에 대한 형질전환 벼의 생리학적 반응	157
가. CaMV 35S promoter를 이용하여 만든 형질전환 벼에 대한 oxyfluorfen의 효과	157
나. Ubiquitin promoter를 이용하여 만든 형질전환 벼에 대한 oxyfluorfen의 효과	158
1) T0 세대	158
2) T1 및 T2 세대	159
3) T3 세대	166
5. 형질전환 벼의 oxyfluorfen에 대한 저항성 기작	178
가. 재배종 벼의 경우	178
나. Ubiquitin promoter에 의해 <i>B. subtilis</i> Protox 유전자를 세포질에 전이 시킨 경우	178
다. Ubiquitin promoter에 의해 <i>B. subtilis</i> Protox 유전자를 plastid에 전이 시킨 경우	179
제 4 절 결과요약	183
1. Oxyfluorfen에 대한 재배종 담배의 엽기별 반응	183
2. Oxyfluorfen에 대한 야생형 담배와 형질전환 담배의 생리학적 반응 비교	183
3. Oxyfluorfen에 대한 밀의 내성 기작	184
4. Oxyfluorfen에 대한 형질전환 벼의 생리학적 반응	184
5. 형질전환 벼의 oxyfluorfen에 대한 저항성 기작	185

제 5 절 참고문헌	187
제 5 장 형질전환 식물의 환경 반응 특이성, 생산성 비교 연구	191
제 1 절 서 설	191
제 2 절 연구 수행 방법	191
1. 형질전환 담배의 온도, 광 및 수분 반응	191
2. 형질전환 벼의 환경 반응 특이성, 생산성 비교	192
가. 비료(N-P-K) 시용량에 따른 형질전환 벼의 생육 반응	192
나. 수분 조건 및 상처에 의한 형질전환 벼의 내성 반응	193
다. 농약의 종류에 의한 형질전환 벼의 내성 반응	193
라. 제초제와 질소의 상호작용 효과(풋트시험)	193
마. 재배환경(재식밀도 x 질소) 변화에 따른 생장 및 수량성(포장시험) ..	194
바. 이앙시기별 형질전환벼의 생육 반응	194
사. 형질전환 식물의 유전적 안정성 평가	194
아. 미질 안정성	195
1) 쌀알의 일반 특성	195
2) 쌀가루의 제조	195
3) 쌀가루의 특성	195
4) 전분의 특성 비교	198
5) 취반미의 특성	200
제 3 절 연구 결과 및 고찰	203
1. 형질전환 담배의 환경 반응 특이성	203
가. 형질전환 담배의 온도 반응	203
나. 형질전환된 담배의 광량 반응	203
다. 형질전환 담배의 수분 반응	203
라. 형질전환 담배의 온실 조건 반응	206
2. 형질전환 벼의 환경 반응 특이성, 생산성, 유전성 비교	207
가. 비료(N-P-K)시용량에 따른 형질전환 벼의 생육 반응	207

나. 건답조건에 의한 형질전환 벼의 생육반응	211
다. 도복에 의한 형질전환 벼의 생육 반응	213
라. 농약의 종류에 의한 형질전환 벼의 내성 반응	216
마. 제초제와 질소의 상호작용에 의한 형질전환 벼의 생장 및 수량성	219
바. 재배환경(재식밀도 x 질소) 변화에 따른 벼의 생장 및 수량성	225
사. 이앙시기별 형질전환벼의 생육 반응	231
아. 형질전환 식물의 유전적 안정성 평가	231
자. 미질 안정성	232
1) 쌀알의 일반 특성	232
2) 쌀의 일반성분	233
3) 쌀의 이화학적 특성	236
4) 호화특성	238
5) 밥의 텍스처	240
6) 관능평가에 의한 밥맛의 특성 비교	241
제 4 절 결과요약	243
제 5 절 참고문헌	245
제 6 절 연구실적	250

제 1 장 서 론

제 1 절 연구 개발의 필요성

현대농업에 있어서 농약의 사용은 비록 최소량일지라도 필수 불가결한 사항이다. 특히 우리 나라에서 안정적으로 작물을 생산, 공급할 수 있는 체계는 농업 인구의 고령화, 인건비의 상승 및 WTO 체제의 출범에 의한 농산물의 수입증대 등으로 인하여 심각한 위기를 맞고 있어서 농업 기계화와 함께 농약의 효율적인 이용성 개발이 당면한 문제의 해결요건으로 제시되고 있다. 제초제는 노동력과 에너지를 절감시켜 농산물의 생산가를 낮춤으로써 농업 생산성 향상에 있어서 지대한 공헌을 하여 왔으나 부수적으로 발생하는 작물 약해와 환경 오염의 문제 때문에 제초 효율을 극대화하기 위한 고도의 작물 선택성에 기인하는 제초제 및 제초제 사용 방법이 새로이 요구되고 있다. 지금까지의 제초제 연구는 주로 제초 작용을 나타내는 화합물의 화학적 합성과 그 합성 산물의 *in vivo* 활성 검정을 중심으로 이루어졌다고 할 수 있으나 우리 나라에서는 아직까지도 단편적인 작물이나 제초제 사용법 개발에 편중되고 있을 뿐만 아니라 농업환경 및 생태계와 조화를 이룰 수 있는 형태의 잡초 방제 기술 개발에 소홀히 하여 왔던 실정이다. 따라서 저농도에서 제초 활성이 뛰어나고, 자연 환경에 대한 피해를 최소화시킬 수 있으면서도 특정 작물에 대한 고도의 선택성을 지닌 제초제를 개발하기 위한 접근 방법의 하나로 제초제와 대상 생물체의 상호작용을 분석하고 파악하는 동시에 그 결과에 따른 생물체의 적절한 변환에 연구의 역점을 두는 연구가 필요할 것으로 생각된다. 제초제 개발에 있어서 이러한 시대적 요구로 인하여 제초제 작용 기작에 관한 그간의 축적된 생화학 혹은 생리적 정보들이 오늘날에 와서는 새롭고 급속히 발전하고 있는 생명 공학 기술과 함께 접목되기 시작하였으며 제초제 유전 공학 기술은 제초제 저항성 식물의 개발뿐만 아니라 제초제의 표적 효소 유전자를 인위적으로 선택 변화시킴으로써 한층 더 강력한 저항성이나 감수성을 지닌 형질전환 식물체를 개발하고 나아가 제초제의 표적 유전자로부터 새로운 기능을 나타낼 수 있는 유용한 유전자를 개발하기 위한 연구들이 진행되고 있다.

DPE계를 포함하는 많은 종류의 광활성 제초제들은 광활성에 의한 활성 산소의 방출

과 이로 인한 지질의 과산화 작용으로 급격한 살초효과를 나타내기 때문에 잔류 독성이 매우 낮을 뿐만 아니라 비수용성으로 토양입자에 쉽게 흡착되며 광산화에 의하여 쉽게 분해되는 경향이 있어서 차세대의 바람직한 제초제로 선택될 수 있는 장점을 지니고 있지만 식물종간의 선택성이 크게 결여되어 몇 가지 작물을 제외하고는 작물의 생육기에 제초 목적으로 사용하기에는 어려운 제한점을 지니고 있다. 이들 종류 제초제의 선택성 제고를 위해서는 이들 제초제의 화학 구조를 골격으로 한 신규 제초제의 개발을 들 수 있으나 신규 제초제 화합물의 합성에 드는 시간과 경비 및 노력을 고려한다면 기존의 광활성 제초제를 활용하면서 작물에 대한 고도의 선택성을 나타낼 수 있는 신기능 작물 품종 개발 방법이 새롭게 모색될 수 있다. 이러한 새로운 제초 방법의 하나로 제초제 내성 유전자를 작물에 도입하여 제초제 저항성 식물을 창출하는 연구들이 미국과 일본을 중심으로 이루어지고 있으며 그 성과도 크게 기대되고 있다. 제초제 저항성 식물의 개발 방법으로는 자연 상태에서 발견된 내성 식물과의 교배 육종, 세포 배양에 의한 돌연변이체의 선발, 원형질 융합 기술과 유전공학 기술에 의한 외부 유전자의 도입 등을 들 수 있는 바, 유전공학 기술에 의한 유전자의 변이 및 형질 전환체의 개발이 가장 효율적이고 성공 가능성이 높은 것으로 생각되고 있다. 실제 acetolactate synthase의 저해제인 imidazolinone계 제초제에 대한 저항성 벼가 개발되어 시판되고 있기도 하다. 그러나 이들 광활성 제초제의 다양한 장점에도 불구하고 저항성 식물의 개발은 세계적으로 아직 미미하며 특히 DPE계 제초제의 작용이 매우 신속한 속도로 일어난다는 점과 작용 기작이 단순하지 않다는 점은 고전적인 방법에 의한 저항성 식물의 개발을 더욱 어렵게 하고 있다.

DPE계 제초제의 작용점으로 알려진 Protogen IX의 산화 반응은 식물체뿐만 아니라 포유류, 이스트, 박테리아 등 헴(heme)이나 엽록소를 필요로 하는 거의 모든 생물체에 필수적으로 존재하는 과정으로 Protox의 작용에 의하여 형성된 Proto IX는 Fig. 1-1에 나타낸 바와 같이 Fe-chelatase나 Mg-chelatase가 관여하여 헴의 생합성과 엽록소의 생합성으로 분지되게 된다. 지금까지의 연구 결과에 따르면 Protox는 진핵생물체의 미토콘드리아와 엽록체의 외막 또는 원핵생물체의 세포막에 존재하며 산소나 호흡 전자 전달계의 일부를 전자 수용체로 사용하여 Protogen IX를 산화시킨다고 알려져 있다. 헴과 엽록소 생합성의 전구 물질인 포르피린은 동물과 식물체에서 필수적

인 역할들을 수행하고 있으나, 박테리아(O'Brian et al., 1987; Ramseier et al., 1989; Sasarman et al., 1979), yeast(Urban-Grimal & Labbe-Bois 1983), 인체(Kappas et al., 1983)에 있어서 Protox 효소가 결합된 경우들이 각각 알려져 있으며 동물의 경우 헴의 생합성 효소군의 하나가 결합되어 생기는 포르피리아(porphyrin)와 같은 유전적 질병은 오래 전부터 알려져 있다. DPE계 광활성 제초제들은 식물체에 존재하는 Protox의 활성을 저해하여(Jacobs et al., 1984; Lee et al., 1994; Matringe et al., 1989) 식물체의 급격한 탈수와 탈색을 유기시켜 식물체를 고사시킴으로써 제초효과를 나타낸다. DPE계 화합물에 의하여 Protox가 저해되면 Protox의 기질인 Protogen IX가 축적되어 엽록체 밖으로 이동되고 원형질 막에 도달한 후 비효소적 또는 DPE에 저항성을 나타내는 PM(plasma membrane)-Protox에 의하여 Proto IX로 산화가 일어나며 그 결과 원형질 막에 축적된 Proto IX는 광에 의하여 singlet oxygen을 만들고 이 singlet oxygen이 지질과산화작용을 일으켜 식물체의 세포막을 파괴하는 것으로 알려져 있다(Jacobs et al., 1991; Lee et al., 1993). Protox는 보리(Jacobs & Jacobs, 1987), yeast(Labbe & Labbe, 1990), 생쥐(Dailey & Kar, 1987; Proulx & Dailey, 1992), 포유류의 간(Siepkner et al., 1987)과 *Desulfovivrio gegas*(Klem & Barton, 1987) 등으로부터 정제된 바 있다. 일반적으로 포유류에 존재하는 Protox는 단일 폴리펩티드로 이루어져 있으며 FAD나 FMN이 조효소로 작용하고 acifluorfen과 같은 광활성 DPE계 제초제에 의하여 활성이 저해되지만 박테리아에 존재하는 Protox는 DPE계 제초제에 의하여 활성이 저해되지 않는 등 yeast나 포유류의 Protox와는 구조적으로나 기능적인 면에서 차이가 있는 것으로 판단되고 있다(Klem & Barton, 1987; Matringe et al., 1989).

다양한 종류의 생물체들에서 관찰되는 Protox의 이러한 기능적 차이는 각 생물체에 존재하는 Protox의 구조상의 차이와 그에 따른 반응 기작의 차이에서 그 근본 원인을 찾아야 할 것이다. 따라서 DPE계 화합물에 대하여 저항성을 나타낼 수 있는 원핵생물의 Protox와 감수성을 나타내는 대표적인 진핵생물의 Protox들에 대한 생리적, 생화학적 기능의 비교 연구가 필수적이며, Protox 유전자 조작 기술을 개발함으로써 특정 제초제에 대한 탁월한 저항성을 지니는 신기능 식물체의 창출이 가능할 것이다. 생산된 신기능 형질전환 식물체에 대하여 환경 반응 특이성과 유전성 및 생산성 연구는

본 연구의 결과를 현장에서 유효하게 적용하기 위하여 필수적인 부분이 될 것이다.

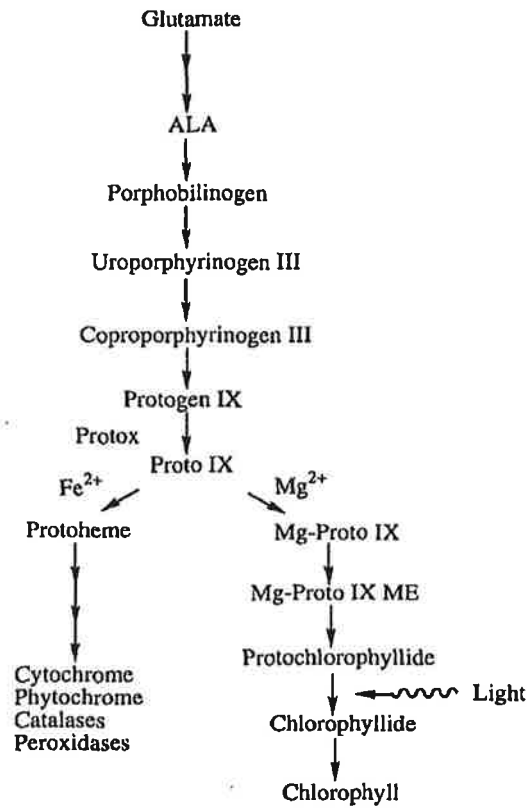


Fig. 1-1. The heme and chlorophyll biosynthetic pathway in higher plants.

제 2 절 국내외 기술 개발 현황

1) 본 연구팀에 의한 지금까지의 연구 개발 실적

본 연구팀은 과학재단의 특정연구과제(과제번호 92-2400-09-01-3)를 통하여 Protox의 특성 및 Protogen IX의 산화반응에 대한 상세한 기작을 밝혔으며, *Bacillus subtilis*의 Protox 유전자를 담배에 도입하는 데 성공하였고, 본 연구팀의 일원인 이희재 박사는 DPE저항성 Protox-like 효소가 식물체의 원형질막에 존재함을 밝히는 연구에 참여한 바가 있다. 따라서 본 연구팀은 DPE계 제초제의 기작과 Protox 유전자

및 형질전환 식물체 생산에 대한 확고한 기틀과 충분한 연구 여건 및 인력을 갖추고 있는 것으로 판단되며 이번 과제에서 추구하고 있는 Protox 유전자의 발현, 형질전환 식물체의 창출 및 농업 생산성 연구를 무리없이 수행할 수 있었다.

2) 국내외 타 연구기관의 연구 내용

Protox는 다양한 종류의 제초제에 대한 작용점으로서 국내외 많은 연구기관의 지대한 관심을 끌어왔다. 그러나 지금까지의 대부분 연구가 동물이나 식물에서 Protox의 생리적 기능이나 기초적인 생화학적 특성을 주로 다루어 왔으며 Protox의 유전자에 관한 연구는 초기 단계에 있고 Protox 유전자를 이용한 형질전환체 생산 연구도 매우 미미하다. 따라서 본 연구를 통하여 Protox 유전자 조작에 대한 기술을 확립하고 형질전환체의 특성들을 밝힘으로써 Protox 유전자의 응용에 대한 새로운 차원의 발전이 기대된다.

제 3 절 연구 개발 목표 및 내용

본 연구팀에서는 지난 3년 동안 특정기초협력연구 과제의 일환으로 광활성 제초제에 대한 저항성 유전자를 클로닝하고 식물체내 발현의 극대화를 연구하였다. 그 과정에서 광활성 제초화합물에 저항성을 나타내는 *Bacillus subtilis*의 Protox 유전자를 담배에 도입하여 oxyfluorfen 저항성 형질전환 식물을 최초로 개발한 바 있다(Choi & Guh, 1995). 본 연구에서는 지난 3년 동안 Protox에 관한 연구로부터 얻은 귀중한 경험과 결과들을 토대로 앞으로 다음과 같은 최종 목표로 연구를 수행하였다.

1) 5년동안 연구의 최종 목표

광활성 제초제의 작용 기작을 이해하고 우수한 형질전환 식물체 개발과 신기능 Protox 고안을 위한 논리적 근거를 제시하기 위하여,

- ① 여러 생물체로부터 Protox 유전자를 탐색, 클로닝하고, 이중 발현 system을 개발하여 다양한 생물체로부터 충분한 양의 순수한 Protox를 확보한다.
- ② 발현된 Protox의 특성과 반응 기작을 분석하고 특히 광활성 제초화합물에 대한 결

합 여부 및 활성 저해 기작을 토대로 Protox 유전자의 인공 변이 전략을 수립한다.

③ 개발되는 형질전환 식물체의 광활성 제초화합물 저항성 및 감수성 기작연구를 위한 전해질 유출, 엽록소의 파괴, malondialdehyde의 생성, Proto IX의 축적, Protox의 활성 등 생리, 생화학적 특성을 비교한다.

우수한 형질전환 식물체를 개발하고 형질전환 식물의 현장 응용을 위하여,

① Protox 유전자의 antisense DNA의 엽록체내 도입 system을 개발한다.

② 담배, 벼의 형질전환 식물에 대한 환경 반응 특이성 및 생산성을 비교한다.

2) 5년 동안의 연구가 성공적으로 진행될 경우 차후 연구 개발 목표

① Protox 유전자의 자리-지정 돌연변이에 의한 신기능 Protox 효소를 개발한다.

② 변이된 Protox 효소의 유전자를 이용한 신기능 형질전환 식물체를 개발한다.

③ DPE계 제초제외에 Protox를 작용점으로 하는 다른 제초제에 대한 저항성 식물체를 개발한다.

④ 벼와 기타 유용식물의 제초제 저항성 확대 방안을 수립한다.

제 2 장 *Bacillus subtilis*와 벼로부터 Prottox 유전자의 클로닝, 발현 및 Prottox 효소의 반응 기작 비교 연구

제 1 절 서 설

대부분의 생물체에 공통적으로 존재하는 Prottox는 생물체의 종류에 따라 구조적으로나 기능적인 면에서 다양성을 보인다. 일반적으로 원핵생물체의 Prottox는 Oxyfluorfen을 비롯한 DPE계 광활성 제초제에 대하여 저항성을 나타내지만, 진핵생물체의 Prottox는 감수성을 나타낸다. DPE계 제초제에 대한 반응에서 Prottox가 보여주는 이러한 다양성은 Prottox의 구조적 차이와 반응 기작의 차이에서 그 원인을 찾아야 한다. 따라서 DPE 계 제초제에 비교적 높은 저항성을 나타내는 *B. subtilis*의 Prottox는 DPE계 제초제에 의한 Prottox의 저항성 기작을 연구하기 위한 좋은 모델이라 할 수 있다. 본 연구에서는 *B. subtilis*의 Prottox 유전자를 대장균에서 이종 발현시켜서 많은 양의 DPE 저항성 Prottox를 생산하고, 생산된 Prottox 효소를 이용하여 반응 속도론적 연구를 수행하였으며, 자리-지정 돌연변이 방법에 의하여 *B. subtilis*의 Prottox에 구조적 변화를 유발함으로써 DPE계 제초제에 보다 더 높은 저항성을 나타낼 수 있는 변이 Prottox 유전자를 개발하고, 이종 발현을 통하여 생산된 변이 Prottox와 DPE계 제초제의 상호작용을 분석함으로써, 변이 Prottox(V311M)가 wild type의 *B. subtilis* Prottox에 비하여 DPE계 제초제에 더 높은 저항성을 보임을 확인하였다. 따라서 변이 Prottox(V311M) 유전자는 DPE계 제초제에 강력한 저항성을 나타내는 형질 전환 작물의 개발을 위한 유전자원으로서 사용될 수 있다.

제 2 절 연구 수행 방법

포르피린 생합성 경로에 존재하는 Prottox 효소의 생물체에 따른 특성을 규명하고

Protox에 의한 산화반응의 기작을 연구하기 위한 방법으로 *B. subtilis*와 벼를 실험 대상으로 삼았다.

1. *B. subtilis*와 벼 Protox 유전자의 이중 발현과 정제

가. Protox 유전자의 발현

Protox 유전자가 삽입된 pBTac1(pBprotox)으로 transformation된 *E. coli* JM105의 single colony를 ampicillin을 포함한 LB 배지에서 overnight 배양한 후 plasmid를 얻어내어 *Hind*III와 *Bam*HI 제한효소로 절단한 뒤 삽입된 Protox 유전자를 전기영동으로 확인하였다.

Transformation 여부를 확인한 뒤 Protox의 발현을 유도하기 위해 ampicillin을 포함한 1L의 LB 배지에 JM105(pBProtox)를 접종하여 37°C에서 배양한 후 600nm에서의 흡광도가 0.6에 달하면 1mM IPTG를 처리하였다. IPTG 처리 후의 Protox 발현 정도를 알아보기 위해 시간별로 배양액을 채취하여 crude extract를 얻어내서 SDS-PAGE하여 비교해 보았다. IPTG 처리 후 5시간이 지나면 Protox가 분해되는 것으로 판단되어 IPTG를 처리한 뒤 4시간만 배양하였다.

나. 이중 발현된 Protox 효소 정제

1) Crude extract

배양을 끝낸 배양액을 원심분리하여 세포를 모아 50mM Tris buffer (1mM EDTA, pH 7.5)로 씻은 후 PMSF와 DTT를 첨가한 50mM Tris buffer 20mL로 현탁시켰다. 계면 활성제인 Triton X-100을 첨가한 뒤 5분 동안 sonication하여 세포막을 파괴하고, 원심 분리하여 crude extract를 얻었다.

2) Ammonium sulfate 침전

얻어진 crude extract에 0~30%(0.332g), 30~60%(0.368g), 60~90%(0.408g)의 ammonium sulfate를 녹여 각 단계에서 침전된 단백질들을 모아 BCA 단백질 정량 방법을 이용하여 정량한 후 500 µg씩 사용하여 Protox의 역가를 측정하였다.

3) Phenylsepharose Chromatography

Protox 역가가 가장 높게 측정된 20~60% ammonium sulfate 침전물의 염을 제거하기 위해 0.01M Tris buffer (pH 7.5) 500mL로 8시간 동안 0°C에서 투석을 실시하였다. Phenylsepharose column을 기포가 생기지 않도록 주의해서 충전한 후 20mM Tris buffer(1mM EDTA, pH 7.5) 500mL로 washing, equilibration한 뒤 염이 제거된 20~60% ammonium sulfate 침전 단백질에 1M KCl을 녹여 column을 통과시켰다. 이 단계에서 사용된 low salt buffer는 10mM Kpi (pH 7.2), 0.1mM EDTA, 0.2% Tween 80이며 100mL를 용출하였고, high salt buffer는 300mM Kpi (pH 7.2), 0.1mM EDTA, 0.2% Tween 80이고 역시 100mL를 용출하였다. 받아들인 30개의 분획물들은 먼저 280nm에서 흡광도를 측정한 후 각각의 역가를 측정하였다. 역가가 높은 분획인 3번과 4번을 각각 Amicon사의 Centriprep(cut-off 30 KD)을 이용해서 농축하여 다시 역가를 측정하였다. 그결과 autooxidation보다 오히려 산화 속도가 떨어져 효소 활성화에 문제가 생긴 것으로 판단하고, 효소 활성을 재생하기 위한 효소의 활성화 실험(reconstitution experiment)을 시도하였다.

4) Mono-Q Chromatography

Low salt buffer(10mM Kpi, 0.1mM EDTA, 0.2% Tween 80, pH 7.2)으로 equilibration시킨 Mono-Q column에 phenylsepharose fraction에서 얻어진 active fraction을 loading시키고 high salt buffer(100mM Kpi, 0.1mM EDTA, 0.2% Tween 80, pH 7.2)로 용출하였다.

다. Protox의 역가 측정

Protox 역가 측정은 Jacobs와 Jacobs (1982)의 방법을 사용하였다. 기질인 Protogen IX를 만들기 위해 3% sodium amalgam으로 0.01M 20% ethanol-KOH 용액에 녹아 있는 200 μ M Proto IX를 환원시켰다. protogen IX는 액체질소에 보관해 두고 역가 측정시마다 사용하였다. 역가 측정에는 HEPES buffer(pH 7.5)를 사용했으며 사용할 기질의 적당량을 알아보기 위해 기질 농도에 따른 Protogen IX의 autooxidation을 측정하여 300 μ L로 결정하였다. 3 μ L cuvette에 HEPES buffer를 넣고, 시료 500 μ g을

넣은 후 기질을 녹여 300 μ L를 취하고 잘 섞은 후에 excitation 395nm, emission 626nm에서 산화 속도를 측정하였다.

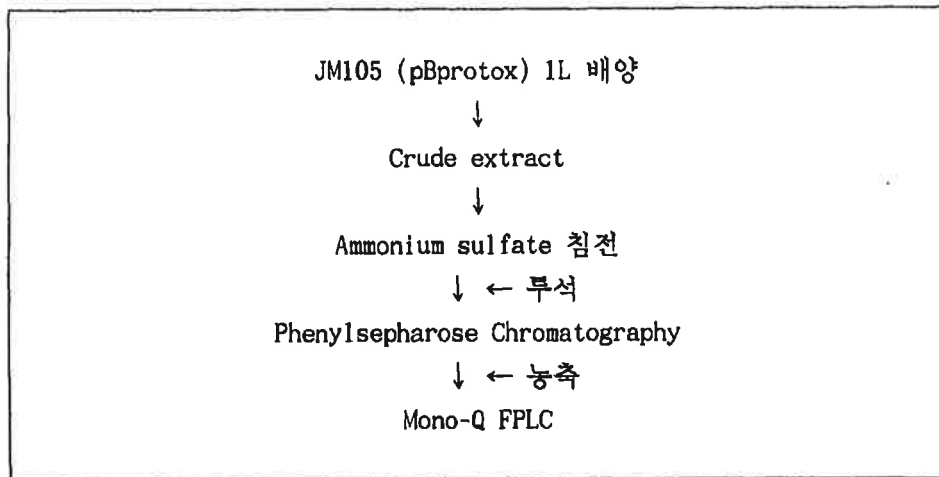


Fig. 2-1. *B. subtilis* Prototoxin 효소 정제 과정.

2. 벼로부터 Prototoxin 유전자의 클로닝

가. 벼로부터 Prototoxin 유전자의 분리

*B. subtilis*의 DNA sequence와 지금까지 알려진 Prototoxin 유전자들의 sequence를 토대로 벼의 cDNA library에서 Prototoxin 탐색을 위한 여러 가지 probe를 결정한다. 다음의 Fig. 2-2 애기장대(*Arabidopsis*)와 벼에서 Prototoxin-1이라고 생각되는 단백질의 일부 아미노산 sequence를 나타낸 것이다.

499--- EGLFLGGNYVAGVALGRCVEGAYETAIE---

--- DGLFLGGNYVAGVALGRCVEGAYESASQ---

Fig. 2-2. *Arabidopsis*와 벼로부터 Prototoxin 효소의 일부 아미노산 배열 순서 비교.

*Arabidopsis*와 벼에서 Prototoxin 효소의 아미노산 sequence는 상동성(homology)이 매우 높음을 알 수 있으며 *B. subtilis*의 Prototoxin와도 상동성이 높다고 생각된다. 따라

서 벼의 cDNA library로부터 Protox 유전자를 탐색하여 확보하는 일은 단기간 내에 이루어질 것으로 생각된다.

나. Protox 유전자들의 DNA sequence 결정 및 분석

*B. subtilis*와 벼로부터 얻은 Protox 유전자의 완전한 DNA sequence를 결정하고 homology 분석, Protogen IX의 결합 부위 등을 DNA sequence 정보로부터 유추한다.

다. 벼에서 Protox 유전자의 클로닝, genomic library screening

위의 실험에 의해 밝혀진 벼 Protox의 cDNA sequence를 probe로 하여 EMBL3 genomic library를 screening하여 2.1kb의 클론을 얻은 후 pSK 벡터에 삽입하였다. 삽입된 부분의 유전자 sequence를 Sanger의 dideoxy 방법에 따라 분석하였다.

3. His-Tag 벡터를 이용한 이중 발현 Protox 효소의 생산

pRSET 벡터를 이용하여 *B. subtilis* Protox 효소를 이중 발현시키고 Ni-column을 사용하여 정제하였다.

4. *B. subtilis* Protox의 항체 제조

GST-Protox fusion protein을 대장균에서 발현시키고 얻어진 단백질을 항원으로 사용하여 rabbit과 mouse에서 항체를 제조하였다. 제조된 항체는 제3 세부과제에서 생산된 형질전환 벼의 Protox 단백질 발현 수준을 검정하기 위하여 사용하였다.

5. Protox 효소의 발현

pRESTB-Protox 벡터를 사용하여 표준 방법에 따라 BL21(DE3)pLysS 에 형질전환시키고 25°C(soluble Protox의 발현의 경우), 혹은 30°C(inclusion body 형성의 경우)에서 배양한 후 OD₆₀₀가 0.5에 달하였을 때, IPTG를 첨가하여 Protox의 발현을 유도하였다. IPTG를 첨가한 후 5-10시간 사이에 원심분리하여 cell을 얻고 PMSF, 1,10-phenanthroline 등을 포함하는 suspension buffer에 cell을 현탁시킨 후, sonication시키고 원심분리하여 상징액과 침전물을 분리하였다. 상징액은 soluble

Protox를 포함하고 있으며, 침전물은 inclusion body를 포함하고 있다.

6. Ni-NTA column을 이용한 soluble Protox 효소의 정제

Ni-NTA column을 이용한 soluble Protox의 정제는 column matrix를 제공하는 Novagen 회사의 표준 방법을 따랐으며 imidazole을 포함하는 완충용액을 이용하여 Protox를 elution 시켰다.

7. Inclusion body로부터 Protox 효소의 추출

침전된 inclusion body를 증류수에 suspension시킨 후, 0.01N NaOH 혹은 10% sodium cholate를 포함하는 sodium phosphate buffer(pH 7.5)를 가하고 1시간 동안 저어준 후 원심 분리하여 상정액을 취하였다.

8. Seedling emergence와 mortality 측정에 의한 형질전환 벼의 oxyfluorfen 저항성 검정

B. subtilis Protox 유전자가 삽입된 낙동벼의 T₁ 세대에서 oxyfluorfen에 대한 저항성을 seedling emergence와 mortality 측정 방법으로 검정하였다.

9. 자리-지정 돌연변이

Mutagenesis는 PCR을 사용하여 수행되었다. PCR에 사용된 template는 pRSET B에 들어 있는 *B. subtilis* Protox이다. 각각 두 가지의 sense primer들과 antisense primer들을 사용하였다. Sense primer들은 5'-GCCTGCAAGCAAACAAAGG-3' (primer A)와 5'-TCCACATCCATGGCAAACGT-3' (primer B)이다. Antisense primer는 5'-ACGTTTGCCATGGATGTGGA-3' (primer C)와 5'-CGACAATGGATTGCTCTCCG-3' (primer D)이다. PCR은 primer sets (primer A 및 C, B와 D), template, dNTPs, 그리고 Taq Polymerase을 이용하여 수행되었다. PCR 조건은 다음과 같다 : 95 °C에서 5 min (1 cycle); 95 °C에서 15 sec, 55 °C에서 15 sec, 72 °C에서 20 sec (15 cycles); 마지막 extension time은 72 °C에서 6 min. PCR을 통해 518 bp과 207 bp의 product가 만들어 졌다. 이들 DNA 조각들은 agarose gel extraction kit (QIAGEN)를 사용하여 정제되었다.

정제된 518 bp와 207 bp DNA 조각을 이용하여 PCR을 재실시하였다. 이 때 사용된 sense primer는 primer A이고 antisense primer는 primer D이다. PCR 조건은 위와 동일하다. PCR 결과 얻어진 706 bp의 DNA를 agarose gel extraction kit로 정제하였다. 정제된 DNA 조각을 *EcoR* I과 *Nde* I으로 자른 후 pRSET B vector에 연결하였다. Vector와 연결된 DNA는 *E. coli* DH5 α cells에 형질전환되었다. 형질전환된 pRSET B-Protox(V311M)을 *BamH* I과 *Hind* III로 절단하여 Protox(V311M)의 크기를 확인하였다. Protox(V311M) 서열은 Sanger's dideoxy method에 의해 확인하였다.

10. Wild type과 변이 Protox 효소의 이종발현

pRSET B-Protox와 pRSET B-Protox(V311M)를 BL21-gold(DE3)pLysS에 형질전환시켰다. 형질전환된 BL21-gold(DE3)pLysS cell을 ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 chloramphenicol (35 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 포함된 Luria Broth (LB) 500 ml에서 배양시켰다 (30 $^{\circ}\text{C}$, 170 rpm). 600 nm에서 O.D. 값이 0.5일 때 1 mM isopropylthiogalactoside (IPTG)를 첨가한 후, 5 hr동안 배양하였다. Cell을 원심분리 (3000 rpm, 15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$)로 모은 다음 0.3 M NaCl, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.2 % *n*-octylglucopyranoside (OGP), 1% 1, 10-phenanthroline을 포함한 sodium phosphate (50 mM, pH 7.4) buffer로 현탁시켰다 (buffer A). Sonicator를 이용하여 cell을 캔 후, 100,000 x g에서 1 시간동안 원심분리하여 상정액을 모았다.

11. Wild type과 변이 Protox의 정제

Ni^{2+} -NTA-agarose resin과 상정액을 1 시간동안 반응시킨 후, column에 채웠다. Resin을 5 mM MgCl_2 , 0.1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 17 % glycerol, 0.1 mM PMSF를 함유하는 HEPES (10 mM, pH 7.9) buffer 15 ml로 씻어 주었다 (buffer B). 5 mM MgCl_2 , 0.1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 17 % glycerol, 0.1 mM PMSF가 포함된 HEPES (10 mM, pH 7.2) buffer 5 ml로 두 번 씻어 주었다 (buffer C). 40 mM imidazole과 100 mM imidazole 그리고 500 mM imidazole 이 포함된 세 가지 종류의 buffer C를 이용하여 Protox 단백질을 용출하였다.

12. Protox 활성의 Assay

Protox 효소의 활성은 spectrophotometer (406 nm)를 이용하여 30 °C에서 10 min 동안 측정되었다. Assay에 사용된 buffer는 100 mM sodium phosphate (pH 7.4), 0.1 mM EDTA and 0.1 % Tween 20이고 (buffer D), 5 μ M의 보조인자 FAD가 첨가되었다.

13. Oxyfluorfen에 의한 Prtox 활성의 억제

Oxyfluorfen을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해시켰다. Assay에서 용매의 최종 농도는 1 %이다. Inhibition assay는 spectrofluorometer를 사용하였다. Excitation 파장과 emission 파장은 각각 395와 622 nm이다.

제 3 절 연구수행 결과 및 고찰

1. Protox 유전자의 발현

pBTac1(pBProtox)로 transformation된 *E. coli* JM105에서 plasmid를 얻어내 HindIII BamHI 제한효소 처리로 insert를 0.7% agarose gel 전기영동으로 확인하였다 (Fig. 2-3).

IPTG 처리 후의 Protox 발현 시간과 정도를 알아보기 위해 시간별로 crude extract 를 모아 SDS-PAGE를 실시하여 밴드를 비교해 보았다. 그 결과 IPTG를 넣은 1시간 내에 이미 Protox가 발현되기 시작했으며 5시간이 지나면 Protox가 분해되는 것으로 보여 발현 시간을 IPTG 처리 후 4시간으로 결정하였다(Fig. 2-4).

2. 이중 발현된 Protox 효소의 정제 결과

Crude extract로부터 출발하여 ammonium sulfate 침전, phenylsepharose chromatography, Mono-Q FPLC를 통한 정제과정에 따른 결과를 Table 2-1과 Fig. 2-5에 나타내었다. Phenylsepharose chromatography 직후에 얻어지는 활성 분획은 장기간 농축할 경우 활성이 상실되는 것을 관찰할 수 있었다.

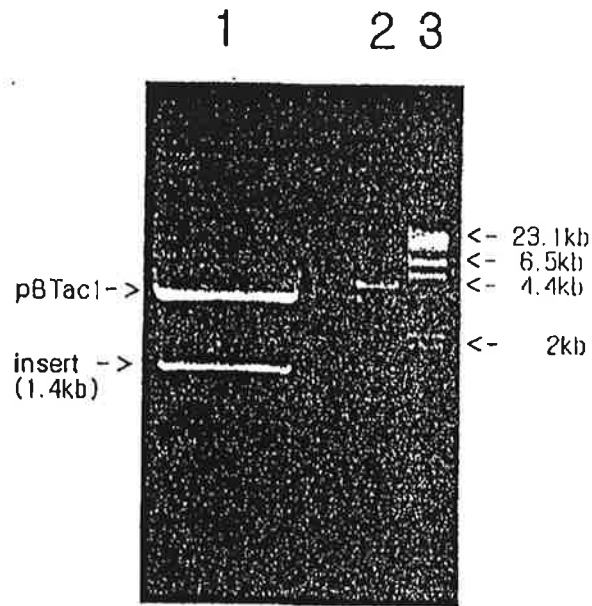


Fig. 2-3. Agarose gel 전기영동상에서 pBProttox의 insert 확인. 1, *Hind*III와 *Bam*HI 으 로 double digestion한 pBProttox; 2, *Hind*III로 처리한 pBProttox; 3, Size marker (λ DNA/*Hind*III).

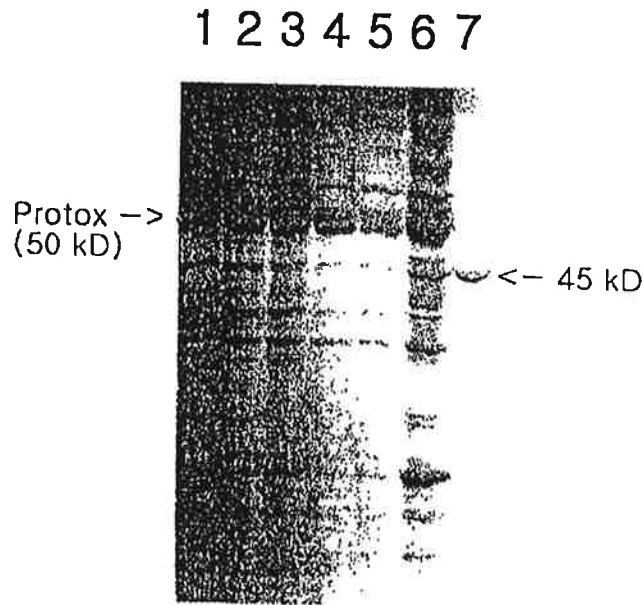


Fig. 2-4. IPTG 처리 후 시간별 Prottox 발현 비교(SDS-PAGE). 1, IPTG 처리 직전; 2, IPTG 처리 후 1시간; 3, IPTG 처리 후 3시간; 4, IPTG 처리 후 5시간; 5, IPTG 처리 후 9시간; 6, IPTG 처리 후 22시간; 7, Size marker(45kD).

Table 2-1. Purification of *B. subtilis* Prottox from heterologous expression in *E. coli*.

Purification step	Total volume (mL)	Total protein (mg)	Activity			Specific activity		Purification fold
			Pass. mix. (μ g)	dF/dt (min^{-1})	dP/dt _{corr} (nM/min)	nM/min/mg	μ U/mg	
Crude extract	40	200	250	0.128	0.80	3.2	9.6	1
20~60% Ammonium sulfate ppt.	4	68	250	0.371	2.32	9.2	27.8	2.896
Phenyl-sepharose chro.	15	27	100	0.224	1.40	14	42	4.375
FPLC	3	0.3	30	0.050	0.31	10	30	3.125

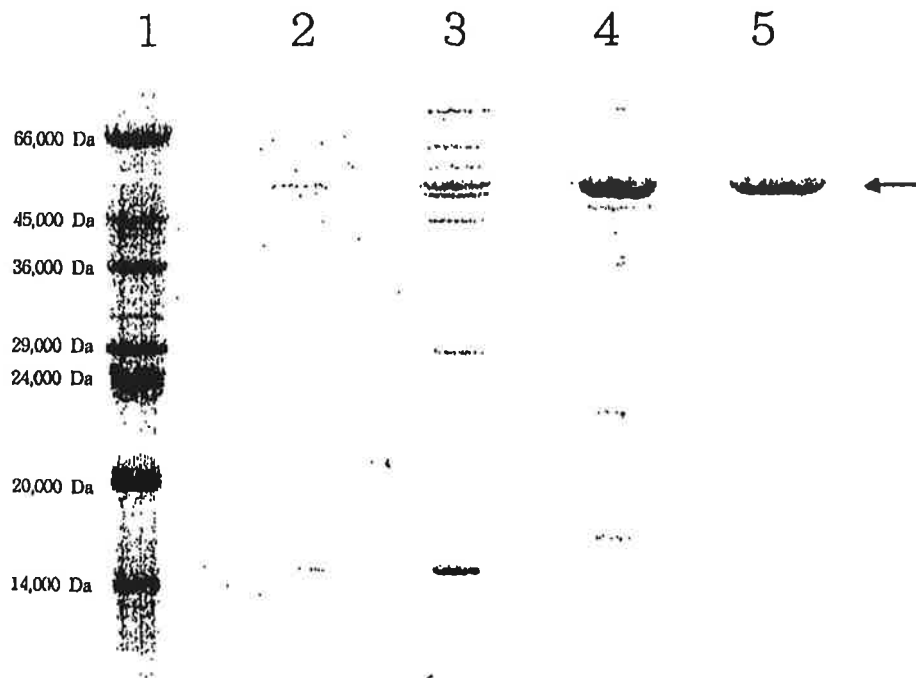


Fig. 2-5. SDS-PAGE of purified Protox. 1, marker; 2, crude extract; 3, ammonium sulfate precipitate; 4, phenylsepharose chromatography; 5, Mono-Q FPLC.

3. Protogen IX의 산화 반응에 대한 유기 조효소 및 금속 조효소의 효과

가. Protox 활성화에 대한 유기 조효소의 효과

Protox 효소에는 FAD binding site가 존재하는 것으로 생각되어 FMN과 FAD의 효과를 알아보았으나 활성의 변화가 관찰되지 않았다. 따라서, 외부에서 가해지는 FMN이나 FAD는 효소의 활성을 증가시키지 않는 것으로 생각된다.

나. Autooxidation에 대한 금속 조효소의 효과

Protogen IX의 비효소적 산화 반응 속도에 대한 금속 이온(Fe^{3+} , Cu^{2+})의 효과를 Fig. 2-6에 나타내었다. Fe^{3+} 와 Cu^{2+} 가 모두 Protogen IX의 산화 속도를 증가시켰으며 Cu^{2+} 에 의한 촉매 효과가 Fe^{3+} 보다 높음을 알 수 있었다.

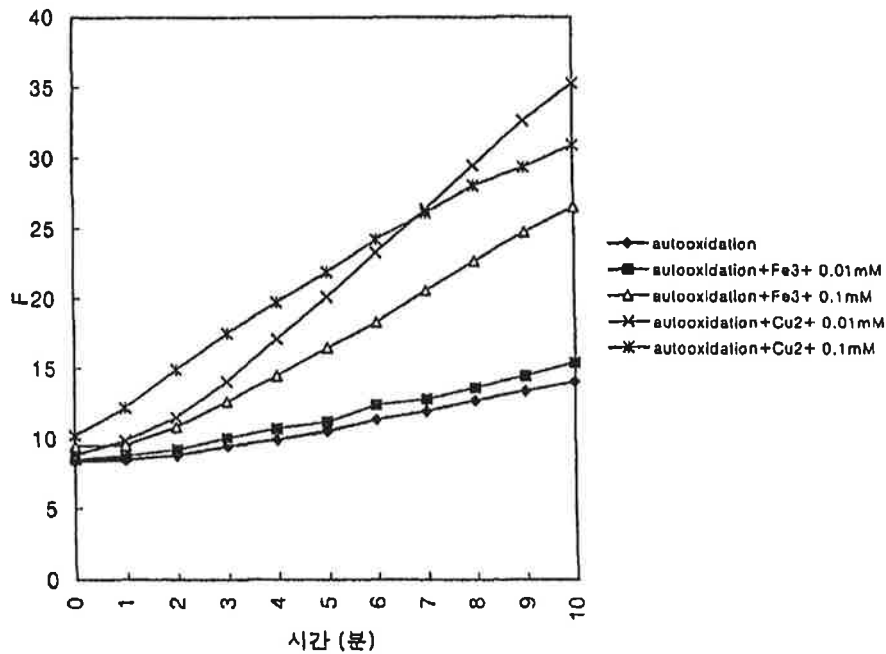


Fig. 2-6. Fe³⁺와 Cu²⁺에 의한 autooxidation 속도 변화 측정

4. Protogen IX 산화 반응의 특성: 비효소적 산화 반응과 효소적 산화 반응의 비교

pBTac 배터를 이용하여 이중 발현된 *B. subtilis* Prottox 효소의 반응에 대하여 Lineweaver-Burke plot을 이용하여 Km 및 Vmax를 측정하였다(Fig. 2-7). 비효소적 산화 반응에 대하여 반응물인 Protogen IX의 농도에 대한 반응의 차수를 결정하기 위하여 Protogen IX의 농도에 대한 자동 산화 반응의 속도를 측정하였으나 Fig. 2-8과 Fig. 2-9에 나타낸 바와 같이 자동 산화 반응의 속도는 효소 반응과 마찬가지로 기질의 농도에 대하여 포화 곡선을 나타내었다. 이러한 결과들은 Protgen IX의 비효소적 산화 반응은 효소적 산화 반응과 유사하게 pre-equilibrium complex를 형성하는 과정이 존재함을 의미하고 있으며, 이러한 preequilibrium complex는 기질 분자들의 association이나 또는 Protogen IX의 6전자 산화 과정에서 나타나는 부분적으로 산화된 중간체일 가능성이 높다.

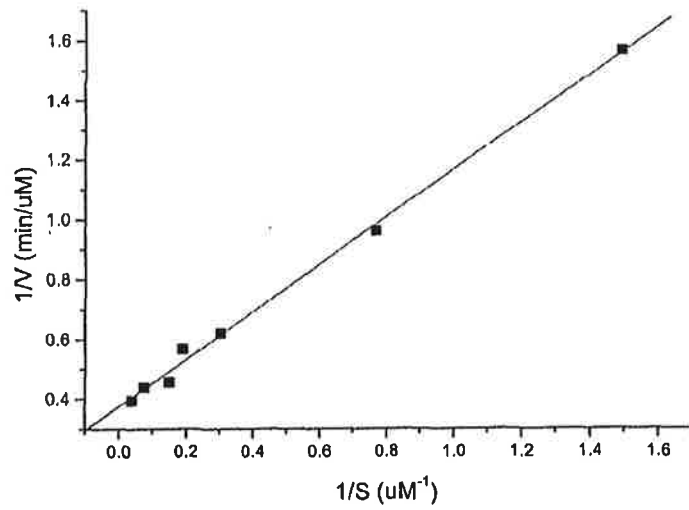


Fig. 2-7. Lineweaver-Burke plot of enzymatic oxidation of Protogen IX

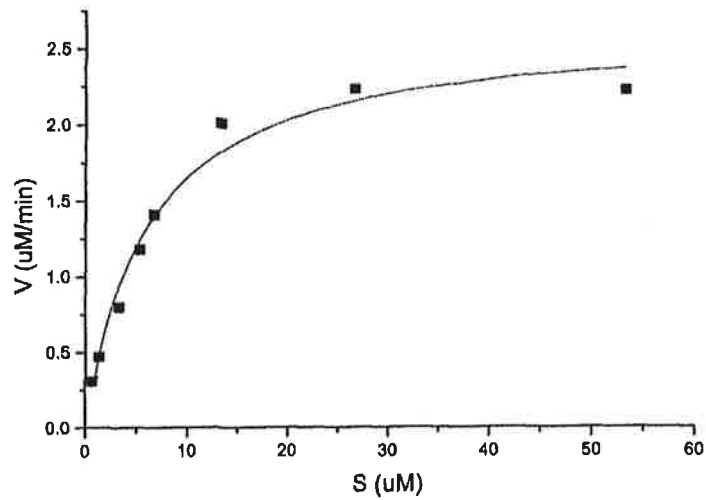


Fig. 2-8. Saturation kinetics of non-enzymatic Protogen IX oxidation.

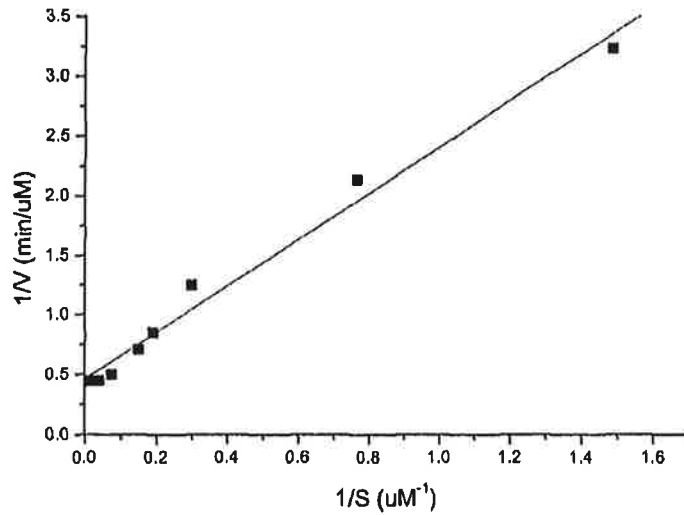


Fig. 2-9. $1/V$ vs $1/S$ plot indicating the Michaelis-Menten behavior of the non-enzymatic oxidation of Protogen IX.

5. 벼의 Prottox 유전자 확보

Prottox 유전자의 consensus sequence를 이용하여 벼 게놈 database를 탐색한 결과 벼의 Prottox 유전자(FL0167) 클론을 얻을 수 있었으며, 일부의 sequence를 밝힐 수 있었다.

6. 벼 Prottox 유전자의 구조

벼의 cDNA library로부터 탐색된 FL0167 클론으로부터 얻어진 1156bp의 벼 Prottox 유전자 염기 서열을 분석하고 *Arabidopsis*의 Prottox 유전자와 염기서열을 비교한 결과, 5'-말단에 약 500bp 정도의 유전자가 손실되어 있음을 알 수 있었다. 손실된 부분의 유전자를 확보하기 위하여 벼의 genomic library(EMBL3)로부터 FL0167 DNA 절편을 이용하여 screening 하였다. 이들 두 가지 클론으로부터 얻어진 벼 Prottox의 염기 배열 순서를 Fig. 2-10에 나타내었다. Genomic library로부터 얻어진 유전자에는 작은 intron에 대한 유전자들이 포함되어 있는 것으로 추정된다.

TGCAGCATAT TGGACGGAGT GGTCTTTCC GCGGTAGTGC GCCCGCGCCC ACGGGAATGC GATTCCCAGC
 CCATTCCACC CCCTTCCCAT TCCGGTGGGC CATTCCGAAT CCAACCAACC AACCAACCAT CGAACCCGCA
 TCGTATCCAC TCCTTCTCCA GTCTCTTCGC CGCTCCGCAT CGCAGCCGC TCGTCAGCGA CGGACATGGC

missing fragment

TTGAGCGCCT CATTGAGCCT TTCTGCTCAG GTGTTTATTG TAGTGTGCAA TTGCTGTTTT GTTTTTGATG AITCAGATAA
 GAATACGGTG ATTTCCGGTG TTAGGTGTGT ATGCTGGTGA TCCTTCAAAG CTCAGTATGA AGGCTGCATT TGGGAAGGTG
 TGGAGGCTGG AGGATACTGG AGGTAGCATT ATTGGTGGAA CCATCA AAACAATCCA GGAGAGGGGG AAAAAACCCA
 AACCGCCGAG GGATCCCCGĈ CTTCCAACGC CAAAGGGCA GACAGTTGCA TCTTTCAGGA AGGGTCTGAC TATGCTCCCG
 GATGCTATTA CATCTAGGTT GGGTAGCAAA GTCAAACITTT CATGGAAGTT GACAAGCATT ACAAAGTCAG ACAACAAGG
 ATATGCATTA GTGTATGAAA CACCAGAAGG GGTGGTCTCG GTGCAAGCTA AAAGTGTGT CATGACCATC CCATCATATG
 TTGCTAGTGA TATCTTGGGG CCACTTTCAA GTGATGCAGC AGATGCTCTG TCAATATTCT ATTATCCACC AGTTGCTGCT
 GTAACGTGTTT CATATCCAAA AGAAGCAATT AGAAAAGAAT GCTTAATTGA CGGAGAGCTC CAGGGTTTCG GCAGCTGCAT
 CCGCGTAGTC AGGGAGTTGA GACTTTAGGA ACAATATATA GCTCATCACT CTTTCCAAAT CGTGCTCCAG CTGGAAGGGT
 GTTACTTCTG AACTACATAG GAGGTTCTAC AAATACAGGG ATTGTTTCCA AGACTGAAAG TGAGCTGGTA GAAGCAGTTG
 ACCGTGACCT CAGGAAGATG CTGATAAATC CTAAGCAGT GGACCCITTG GTCCTTGGCG TCCGGGTATG GCCACAAGCC
 ATACCACAGT TCCTCATTGG CCATCTTGAT CATCTTGAGG CTGCAAATCT GCCTGGCAA GGTGGTTATG ATGGATTGTT
 CCTCGAGGAC TATGTTCCAG AGTTGCCCTG GGCCGATGCG TTGAAGGTGC ATATGAGAGT GCCTCACAAA TATCTGACTA
 CTGACCAAG TACGCCTACA AGTGATCAAA GTTGGCCTGC TCCTTTTGGC ACATAGATGT GAGGCTTCTA GCAGCAAAAA
 TTTGATGGC ATCTTTTAT CCTGATTCTA ATTAGTTAGA ATTTAGAATT GTAGAGGAAT GTTCCATTTG CAGTTTCATAA
 TAGTTGTTCA GATTTCAGCC ATTCAATTG TGCAGCCATT TACTATATGT AGTATGATCT TGTAAGTACT ACTAAGAACA
 AATCAATTAT ATTTTCCTGC AAGTGACATC TCAATCGTCA GCAAAAAAAA AAAAAA

Fig. 2-10. The partial nucleotide sequences of the rice Protox gene.

Fig. 2-10에서와 같이 밝혀진 벼 Protox의 cDNA sequence를 probe로 하여 EMBL3 genomic library를 screening한 결과로 얻은 2.1kb의 클론을 pSK 벡터에 삽입하였다. 지금까지 밝혀진 genomic rice Protox의 sequence는 Fig. 2-11에서와 같다.

7. His-Tag 벡터를 이용한 이종 발현 Protox 효소의 생산

pRSET 벡터를 이용하여 *B. subtilis* Protox 효소를 이종 발현시키고 Ni-column을 사용하여 분리·정제하였다(Fig. 2-12).

```

5-catattgg acggagtggg tccttccgcg gtagctgogc ccgccccac gggaatgoga ttcccagccc
attccacccc ctcccattc cgggtgggcca ttccgaatca accaaccaac caaccatcga acccgcaccc
gcatcgtatc cactcctctc cagtctccc gccgctccgc atcccgcagc cgctcgtcag cgacggacat
ggccgcccgc gcccagcca tggccaccgc cacctccgcc acggcaacgc cggcctgccg acttccgacg
gCGCGAGGAG gACCCGCCga cGCGCCACg ttcgctgogc cgtcggcagc ggCGCGGCGC aggcgcccgc
ggcgcggggg gcgcgggtgt cggcggactg cgtcgtgggt ggCGGCGGCa tcagcgggct ctgcaccgcg
caggcgctgg ccacaaagca cggcgtcggc gacgtgctcg tcacggaggc ccgccccgc cccggcggca
acatcaccac cggcagcgc gccgCGAGg gctacctctg ggaggagggg cccaacagct tccagccttc
cgaccccgtc tcacatggc cgtacgtcct tccttggcct tcccccttt ccttcctttc cttgatttc
ttccttccgc cggccggaga ccgacctga atgggaatgg gaatgggtgt gcatggattg gggcgcgcag
gtggacagcg ggctcaagga cgatctcgtg ttCGGGgacc ccaacCGcc ggCGgttcgt gctgtgggag
gggaagctaa gcccgtgcc gtccaagccc ggCGacctgc cgttcttoga cctcatgagc atcccggca
agctcagggc cggccttggc gcgctcggcg ttcgaccgcc acctccagtt tgtgtgctct ccccgttgtg
cattcttgat tcaacttgtg aaattcgatt gtgctgagcg tttccggcga aggtttcagg ggcgtgagga
gtcgggtggag gacttcgtgc ggCGcaacct cggCGCGGag gtctttgagc gcctcattga gcctttctgc
tcagggtgtt attgtagtgt gcaattgctg tttgttttt gctgattcag ataagaatac ggtgatttcg
gtgcttaggt gtgatgctg gtgatcctc aaagctcagt atgaaggctg catttgggaa ggtgtggagg
ctggaggata ctggaggtag cattattggt ggaacctca aaacaatcca ggagagggggg aaaaaccca
aaccgcccag ggatccgtga gtgagaaatt gccttcttg ttggattaat tgtccattgt gttacactga
tatgccttca ccatttttag ccgcttcca acgccaagg ggca<1372>

```

Fig. 2-11. Genomic library에서 얻어진 벼 Protox 유전자의 염기 배열 순서.

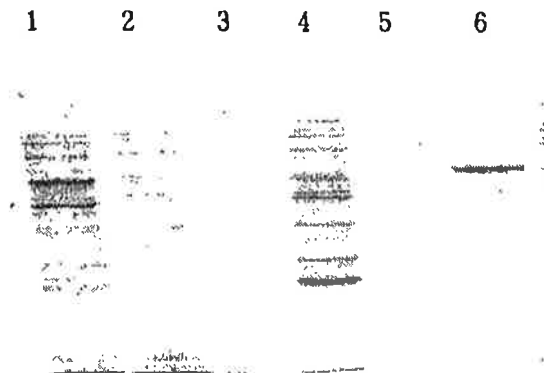


Fig. 2-12. Ni-column을 이용한 이종 발현 *B. subtilis* Protax 효소의 분리. 1, crude extract (40 μ g); 2, eluent of buffer D; 3, eluent of buffer E; 4, eluent of buffer E + 40mM imidazole; 5, eluent of buffer E + 100mM imidazole; 6, eluent of buffer E + 500mM imidazole.

8. *B. subtilis* Prottox의 항체 제조

GST-Prottox fusion protein을 대장균에서 발현시키고 얻어진 단백질을 항원으로 사용하여 rabbit과 mouse에서 항체를 제조하였다.

9. Prottox 효소의 발현 및 inclusion body의 생성

Prottox 유전자가 삽입된 pRSETB-Prottox 벡터를 BL21(DE3)pLys에 transformation시키고 형질전환된 대장균의 성장곡선을 Fig. 2-13에 나타내었다. Prottox 유전자를 포함하는 대장균의 성장은 정상적이었으나, Prottox 유전자를 포함하지 않는 대장균에 비하여 더 빠른 시간에 포화 상태에 도달함을 알 수 있었다. 이러한 사실은 Prottox 효소를 과대발현이 대장균의 성장을 지연시키고 있음을 나타낸다.

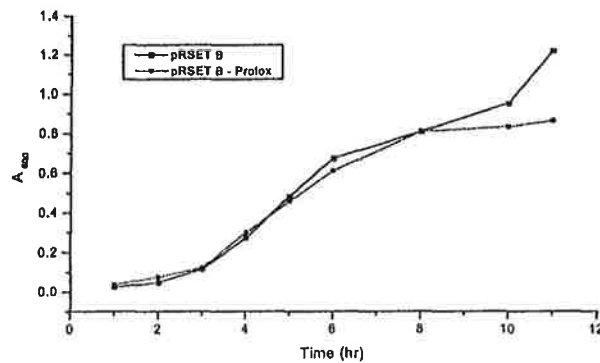
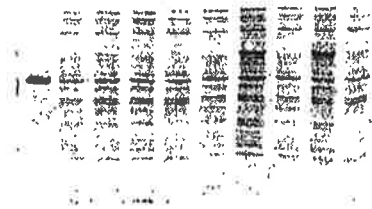


Fig. 2-13. pRSETB-Prottox를 이용하여 형질전환한 대장균의 성장곡선.

Fig. 2-14는 형질전환한 대장균으로부터 발현된 Prottox 효소의 시간별 분석 결과이다. IPTG를 첨가한 후 5시간 후에 Prottox가 soluble form으로 최대로 발현됨을 알 수 있었으며, 7시간 후에는 발현량이 적어짐을 알 수 있다. 이러한 현상은 IPTG를 첨가한 후 일정 시간이 지나면 inclusion body를 형성하거나, 또는 protease에 의하여 분해되고 있음을 나타내는 것으로 생각된다.

① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩



① Size marker (45 kDa) ② pRSETB 0 h ③ pRSETB-Prottox 0 h ④ pRSETB 1 h
 ⑤ pRSETB-Prottox 1 h ⑥ pRSETB 3 h ⑦ pRSETB-Prottox 3 h ⑧ pRSETB 5 h
 ⑨ pRSETB-Prottox 5 h ⑩ pRSETB-Prottox 7 h

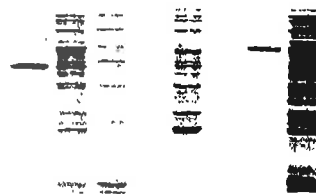
Fig. 2-14. BL21(DE3)pLysS에서 과대 발현되는 Prottox 효소의 SDS-PAGE.

10. Ni-NTA column을 이용한 soluble Prottox 효소의 정제

Soluble form으로 발현된 Prottox 효소를 Ni-NTA column을 이용하여 정제한 결과를 Fig. 16에 나타내었다. 발현된 Prottox의 His-tag 부분이 Ni-column과 잘 결합하고 있음을 알 수 있었으며 상당한 수준의 순도로 soluble Prottox를 얻을 수 있었다(Fig. 2-15, lane 7).

washing buffer - HEPE buffer (pH 7.9)
 elution buffer 1 - HEPE buffer (pH 7.2)
 elution buffer 2 - HEPE buffer (pH 7.2) + 40 mM Imidazole
 elution buffer 3 - HEPE buffer (pH 7.2) + 100 mM Imidazole
 elution buffer 4 - HEPE buffer (pH 7.2) + 500 mM Imidazole

① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧



① size marker (45 kDa) ② crude 40 µg ③ washing buffer ④ elution buffer 1
 ⑤ elution buffer 2 ⑥ elution buffer 3 ⑦ elution buffer 4 ⑧ crude 120 µg

Fig. 2-15. Ni-NTA column을 이용한 정제한 Prottox 효소의 SDS-PAGE.

11. Soluble Protox 효소 활성화에 미치는 FAD의 효과

정제된 Protox 효소가 FAD를 cofactor로 요구하는지 알아보기 위하여 정제된 Protox에 FAD를 첨가한 후 활성을 비교하여 그 결과를 Table 1에 나타내었다. FAD의 첨가에 의하여 Protox 효소의 활성이 증가함을 알 수 있었으며, 이러한 결과는 FAD가 Protox의 cofactor임을 나타낸다.

Table 2-2. FAD의 첨가에 의한 Protox 효소의 활성 변화.

Substrate		Slope
Substrate		2078
Crude	10 μ L	5106
	100 μ L	45180
Protox	10 μ L	3980
	100 μ L	2929
Protox + 5 μ M FAD		4568

12. Inclusion body의 형성

IPTG를 첨가하면 soluble Protox의 양이 현저히 줄어들었는데 이러한 현상은 Protox의 대량 생산에 심각한 영향을 주므로 발현량이 줄어드는 이유를 밝히고 발현 방법을 개선이 절실히 요구된다. 발현 도중 inclusion body의 형성 여부를 알아보기 위하여 pellet과 supernatant 부분으로 나누어서 SDS-PAGE 로 Protox의 발현량을 알아보았다. Fig. 2-16에 나타낸 바와 같이 매우 많은 양의 발현된 Protox가 pellet으로 침전됨을 알 수 있었으며 이러한 현상은 inclusion body가 생성되고 있음을 시사하고 있다. 뿐만 아니라 형성되는 pellet 의 거의 대부분이 Protox 임을 확인할 수 있었다.

13. Inclusion body로부터 Protox 효소의 추출

형성된 inclusion body로부터 Protox 효소를 추출하기 위하여 0.01N NaOH와 10% sodium cholate를 사용하였다. Fig. 2-17은 SDS, NaOH, sodium cholate에 의하여 추출되는 Protox 효소를 SDS-PAGE로 분석한 결과이다.

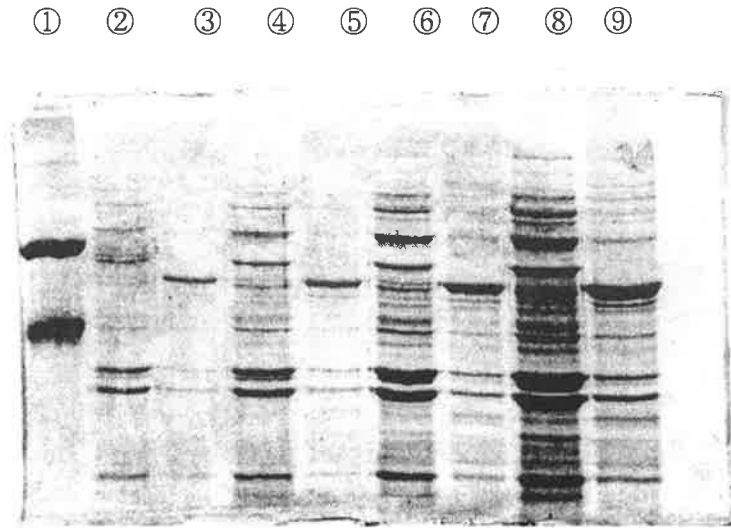


Fig. 2-16. Protox 발현중 soluble fraction과 pellet의 SDS-PAGE. ①, size marker(45, 66 kDa); ②, supernatant 50; ③, pellet 50; ④, supernatant 100; ⑤, pellet 100; ⑥, supernatant 200; ⑦, pellet 200; ⑧, supernatant 500; ⑨, pellet 500.

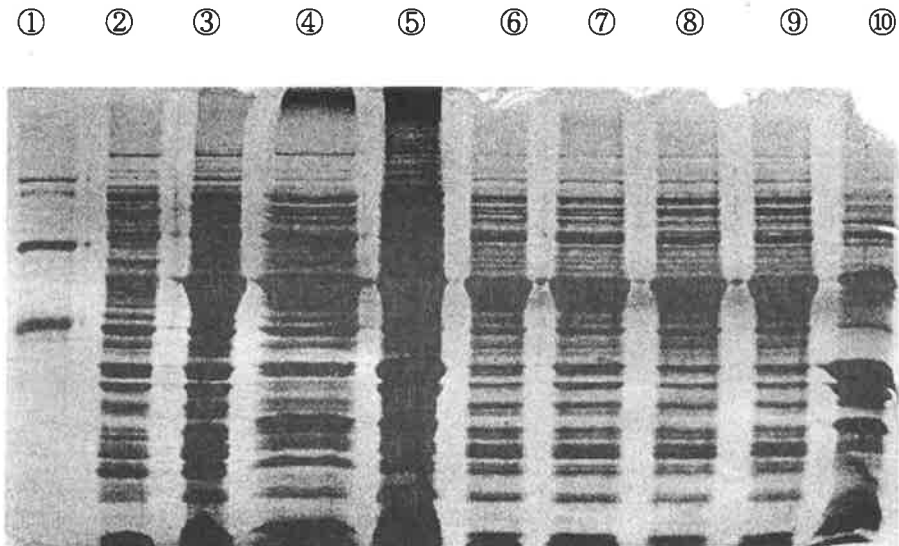


Fig. 2-17. 0.01N NaOH, SDS, sodium cholate에 의하여 추출되는 Protox 효소의 SDS-PAGE. ①, size marker; ②, supernatant; ③, pellet; ④, 10% sodium cholate supernatant; ⑤, 10% sodium cholate pellet; ⑥, 0.1% SDS; ⑦, 0.5 % SDS; ⑧, 0.01N NaOH; ⑨, 0.01N NaOH + HCl supernatant; ⑩, 0.01N NaOH + HCl pellet.

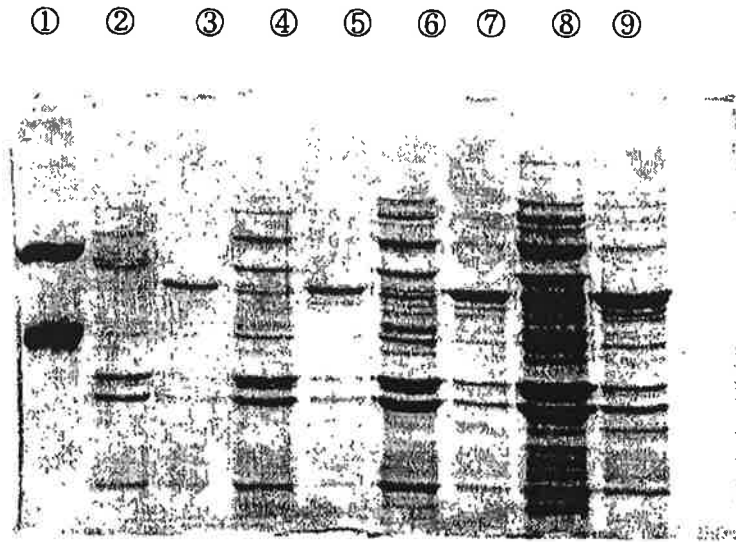


Fig. 2-16. Protox 발현증 soluble fraction과 pellet의 SDS-PAGE. ①, size marker(45, 66 kDa); ②, supernatant 50; ③, pellet 50; ④, supernatant 100; ⑤, pellet 100; ⑥, supernatant 200; ⑦, pellet 200; ⑧, supernatant 500; ⑨, pellet 500.

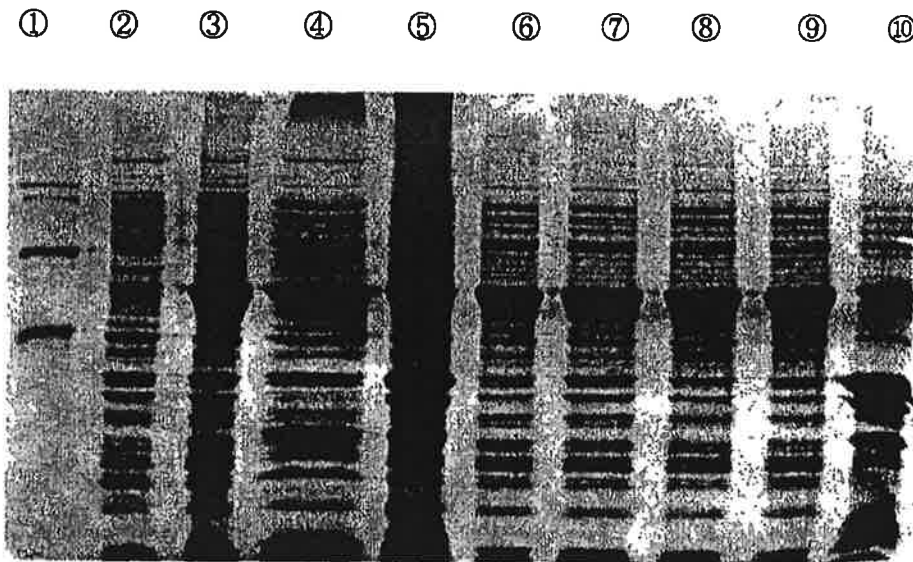


Fig. 2-17. 0.01N NaOH, SDS, sodium cholate에 의하여 추출되는 Protox 효소의 SDS-PAGE. ①, size marker; ②, supernatant; ③, pellet; ④, 10% sodium cholate supernatant; ⑤, 10% sodium cholate pellet; ⑥, 0.1% SDS; ⑦, 0.5 % SDS; ⑧, 0.01N NaOH; ⑨, 0.01N NaOH + HCl supernatant; ⑩, 0.01N NaOH + HCl pellet.

대부분의 inclusion body는 0.01N NaOH에 가용되었으나, 가용된 Protox의 활성을 측정된 결과 상당량의 활성이 소실됨을 알 수 있었다. 그러나 sodium cholate를 사용하여 추출한 Protox는 대부분의 활성을 유지하고 있었으므로 Protox 효소의 대량생산에는 sodium cholate를 이용하는 것이 바람직할 것으로 생각되었다.

14. Seedling emergence와 mortality 측정에 의한 형질전환 벼의 oxyfluorfen 저항성 *B. subtilis* Protox 유전자가 삽입된 낙동벼의 T₁ 세대에서 oxyfluorfen에 대한 저항성을 seedling emergence와 mortality 측정 방법으로 검정하였다(Figs. 2-18, 19).

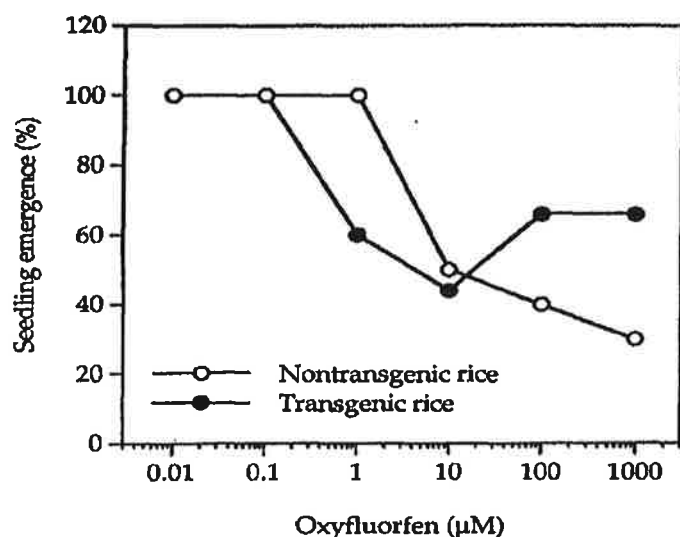


Fig. 2-18. Dependence of seedling emergence of nontransgenic and transgenic rice seeds on the concentration of oxyfluorfen.

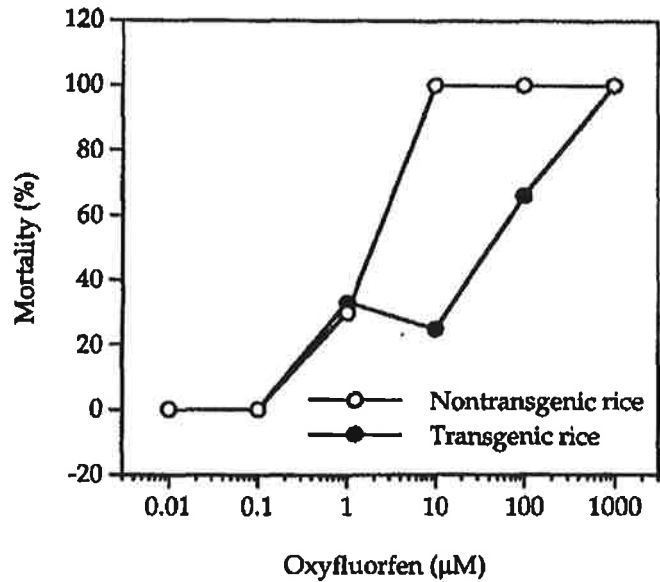


Fig. 2-19. Dependence of mortality of emerged seedlings of nontransgenic and transgenic rice plants on the concentration of oxyfluorfen.

15. 형질 전환 벼의 T₁ 세대에서 DPE 저항성 검정을 위한 germination inhibition assay 방법의 개발

형질을 전환하지 않은 벼와 형질전환 벼(cv. Hwasung T₁)의 종자에 대하여 0.01%의 Goal(oxyfluorfen의 상품명)을 처리하고 처리한 종자의 발아율과 발아한 식물체의 mortality를 측정함으로써 형질전환된 벼의 T₁ 세대에서 oxyfluorfen에 대한 저항성을 검정할 수 있는 시스템을 개발하였다. Fig. 2-20은 CaMV 35S promoter를 사용하여 형질을 전환한 벼의 경우를 나타내고 있으며, 이러한 결과는 leaf-disc assay 방법과 잘 일치하고 있다.

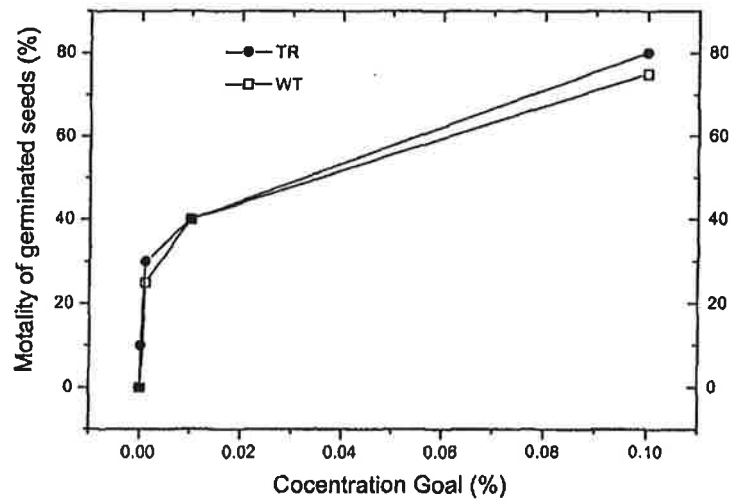


Fig. 2-20. Evaluation of oxyfluorfen resistance by germination inhibition

16. 자리-지정 돌연변이

C. reinhardtii Protox는 제초제에 민감하지만, *C. reinhardtii* Protox의 Val389Met은 제초제에 저항적이다. *C. reinhardtii*의 V389M은 *B. subtilis* Protox의 V311에 해당한다. 그러므로 *B. subtilis* Protox의 311번째 Val을 Met으로 치환하는 실험을 수행하였다. 첫 번째 PCR로 518 bp와 207 bp의 DNA 조각들이 획득되었다. (Fig. 2-21A) 정제된 이들 두 조각의 DNA를 사용하여 PCR을 수행한 결과 706 bp 조각을 만들었다. (Fig. 2-21B) Ligation과 형질전환 후 plasmid를 *BamH* I과 *Hind* III로 절단하였고, 2.9 kb과 1.4 kb의 band를 확인하였다(Fig. 2-21C). 돌연변이 실험 결과, 변화된 염기와 아미노산 서열은 Fig. 2-22과 같다.

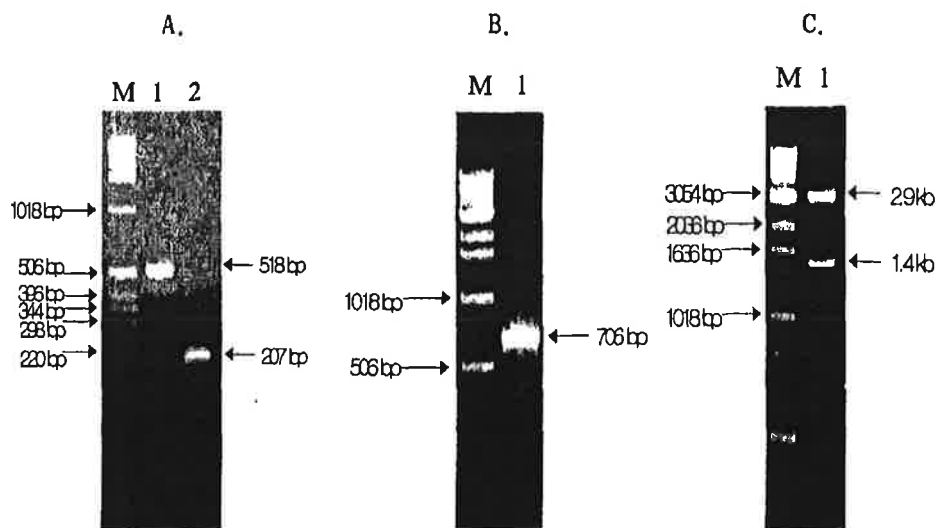


Fig. 2-21. Agarose gel electrophoresis

- A. First PCR product using the four primers and pRSET B-Protox
- B. Second PCR product using the two primers and first PCR products
- C. Plasmid was digested using *BamH* I / *Hind* III

1 atgagtgacggcaaaaaacatgtagtcatcatcggcggcggcattaccggtttagccgcc
M S D G K K H V V I I G G G I T G L A A 20
61 gccttctatatggaaaaagaaatcaaagaaaagaatctgccgcttgagctgacacttggt
A F Y M E K E I K E K N L P L E L T L V 40
121 gaggcaagtccgagagtcggcgggaaaatccagactgtcaagaaagacggctatatcatc
E A S P R V G G K I Q T V K K D G Y I I 60
181 gaaagagggccagactcatttctggaacgaaagaaaagcggcccgagcttgtaaagac
E R G P D S F L E R K K S A P Q L V K D 80
241 ttaggtcttgagcatttgctgtcaacaatgcgaccgggcaatcctatgtgcttgtaaac
L G L E H L L V N N A T G Q S Y V L V N 100
301 cgcaccctgcatccaatgccgaaggcgctgtaatggggataccgacaaaaattgcgccg
R T L H P M P K G A V M G I P T K I A P 120
361 ttgtttctacgggtctgttttctgtccgggaaggcgagagctgctatggatttcac
F V S T G L F S L S G K A R A A M D F I 140
421 ctgcctgcaagcaaaacaaggatgatcagtcattgggagaattcttccgcagacgtgtc
L P A S K T K D D Q S L G E F F R R R V 160
481 ggagatgaagtggctcgagaacttaatcgagccgctactatcagggatctacgcaggcgac
G D E V V E N L I E P L L S G I Y A G D 180
541 attgacaagctcagcctgatgtcgacatttccgcaatttatcagacggaacaaaagcat
I D K L S L M S T F P Q F Y Q T E Q K H 200
601 agaagcctgatttctcgcatgaaaaaacaaggcctcaaggctcaggccagcagctgacg
R S L I L G M K K T R P Q G S G Q Q L T 220
661 gcaaaaaaacaagggcagttccaactctgtcaaccggtttgcagaccctttagaagag
A K K Q G Q F Q T L S T G L Q T L V E E 240
721 atcgaaaagcagttaaagctgacgaaggtgtataaaggcacaaaagtgaccaaacttagc
I E K Q L K L T K V Y K G T K V T K L S 260
781 catagcggctcttgctattcgcctcgaactggataacggcgtcacacttgatgctgattca
H S G S C Y S L E L D N G V T L D A D S 280

841 gtaattgtgactgctccgcataaagcggctgCGGgaatgctttctgagcttcctgccatt
V I V T A P H K A A A G M L S E L P A I 300

901 tctcatttgaaaaatgatgactccacatccatggcaaacgtcgttttaggtttccctgaa
S H L K N M H S T S M A N V A L G F P E 320

961 ggctccgtccaaatggagcatgagggcacgggtttgtcatttcaagaaacagtgacttt
G S V Q M E H E G T G F V I S R N S D F 340

1021 gcgatcacagcctgtacgtggacgaataaaaaatggccgcacgcagcgcggaaggcaaa
A I T A C T W T N K K W P H A A P E G K 360

1081 acgctgcttcgggcatatgtcggaaaagccggagacgaatccattgtcgatctatcagat
T L L R A Y V G K A G D E S I V D L S D 380

1141 aatgacattatcaacattgtgtagaagacttaaagaaagtcatgaacataaacggcgag
N D I I N I V L E D L K K V M N I N G E 400

1201 ccggaatgacatgtgtaaccgatggcatgaaagcatgccgagcaccatgtcggccat
P E M T C V T R W H E S M P Q Y H V G H 420

1261 aagcagcgtatcaaggagctgCGTgaagcacttgcattctgCGTatccgggtgtttatg
K Q R I K E L R E A L A S A Y P G V Y M 440

1321 acaggcgcttctttcgaaggtgCGGcattcccgactgcattgatcaaggaaaagctgcc
T G A S F E G V G I P D C I D Q G K A A 460

1381 gtgtctgacgcgcttacctatttattcagctaa
V S D A L T Y L F S - 470

Fig. 2-22. Nucleotide and amino acid sequences of the pRSET B-Prottox(V311M).
The changed sequence is underlined.

17. Wild type과 변이 Prottox 효소의 생산

E. coli BL21-gold(DE3) pLysS에 형질전환시킨 pRSET B-Prottox의 성장속도는 pRSET B에 비해 느렸다(Fig. 2-23).

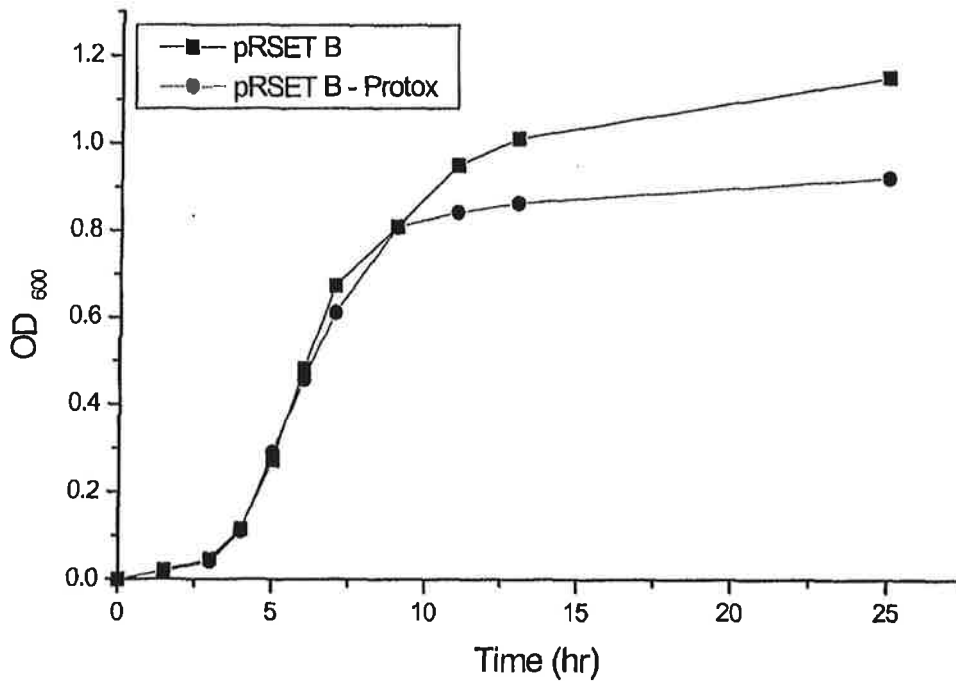


Fig. 2-23. Growth curve of BL21-gold(DE3)pLysS/pRSET B and BL21-gold(DE3)pLysS/pRSET B-Protox at 30 °C. When a cell density of A_{600} was 0.5, IPTG (1 mM) was added. 반면, pRSET B-Protox(V311M)를 형질전환시킨 BL21-gold(DE3)pLysS는 성장 속도가 pRSET B보다 빨랐다. (Fig. 2-27) 형질전환된 BL21-gold(DE3)pLysS cells의 성장 양상은 Protox enzyme의 과량발현이 *E. coli* cell의 성장에 커다란 영향을 미친다는 것을 지시한다. SDS-PAGE 결과, Protox 효소는 IPTG 첨가 후 3 hr과 5hr에 발현되었고, 5 시간 후에는 분해되기 시작하였다. (Fig. 2-24와 Fig. 2-28) 활성 측정결과 IPTG 첨가 후 5 시간의 Protox 효소가 가장 높은 활성을 보였다. (Fig. 2-25와 2-29) N-말단에 존재하는 histidine 잔기에 의해 Ni^{2+} -chelate column과 결합된 Protox 단백질은 높은 농도의 imidazole에 의해 용출되었다. Fig. 2-26과 Fig. 2-30의 SDS-PAGE는 Ni^{2+} -NAT-agarose column으로부터 pRSET B-Protox 단백질과 pRSET B-Protox(V311M) 단백질이 정제되었음을 보여준다.

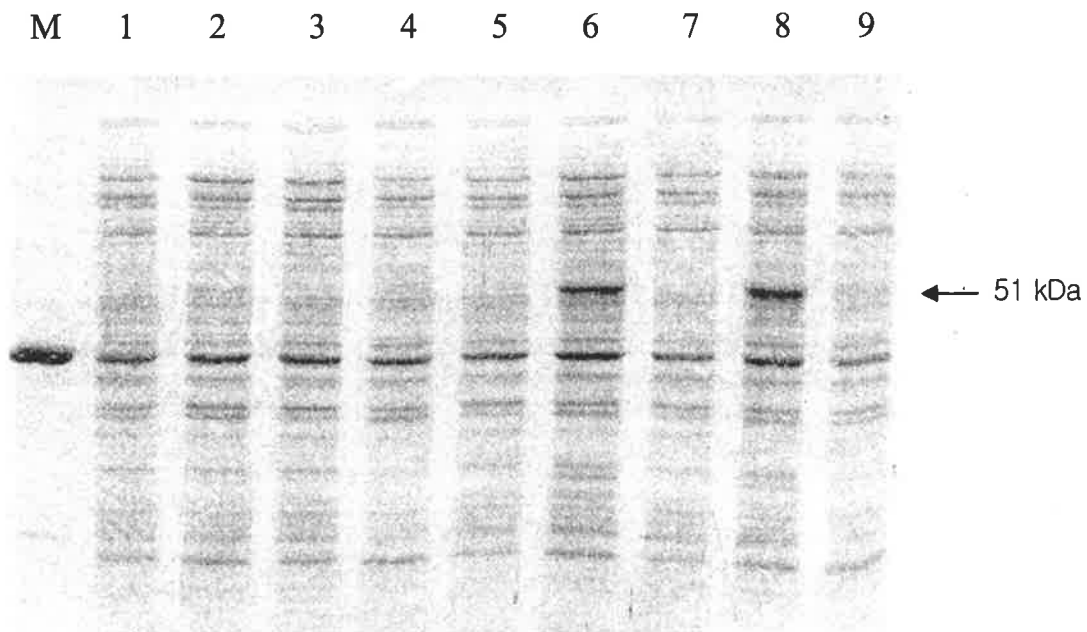


Fig. 2-24. SDS-PAGE of IPTG-induced pRSET B and pRSET B-Prottox

M : Size marker (45 kDa)

1 : 0 hr pRSET B

2 : 0 hr pRSET B-Prottox

3 : 1 hr pRSET B

4 : 1 hr pRSET B-Prottox

5 : 3 hr pRSET B

6 : 3 hr pRSET B-Prottox

7 : 5 hr pRSET B

8 : 5 hr pRSET B-Prottox

9 : 7 hr pRSET B-Prottox

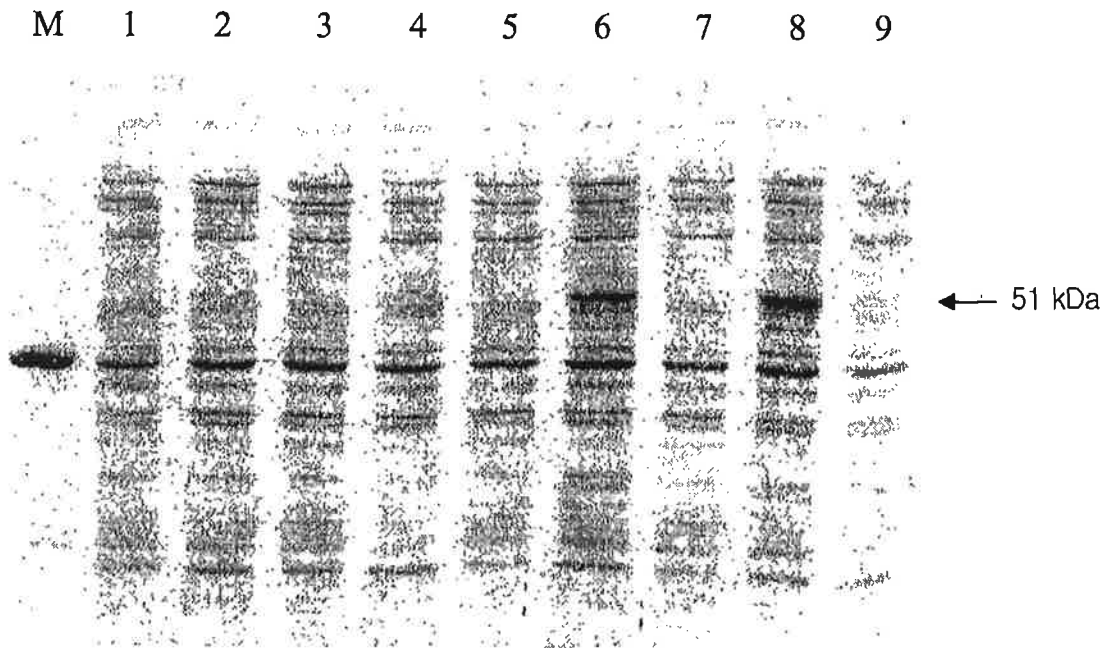


Fig. 2-24. SDS-PAGE of IPTG-induced pRSET B and pRSET B-Prottox

M : Size marker (45 kDa)

1 : 0 hr pRSET B

2 : 0 hr pRSET B-Prottox

3 : 1 hr pRSET B

4 : 1 hr pRSET B-Prottox

5 : 3 hr pRSET B

6 : 3 hr pRSET B-Prottox

7 : 5 hr pRSET B

8 : 5 hr pRSET B-Prottox

9 : 7 hr pRSET B-Prottox

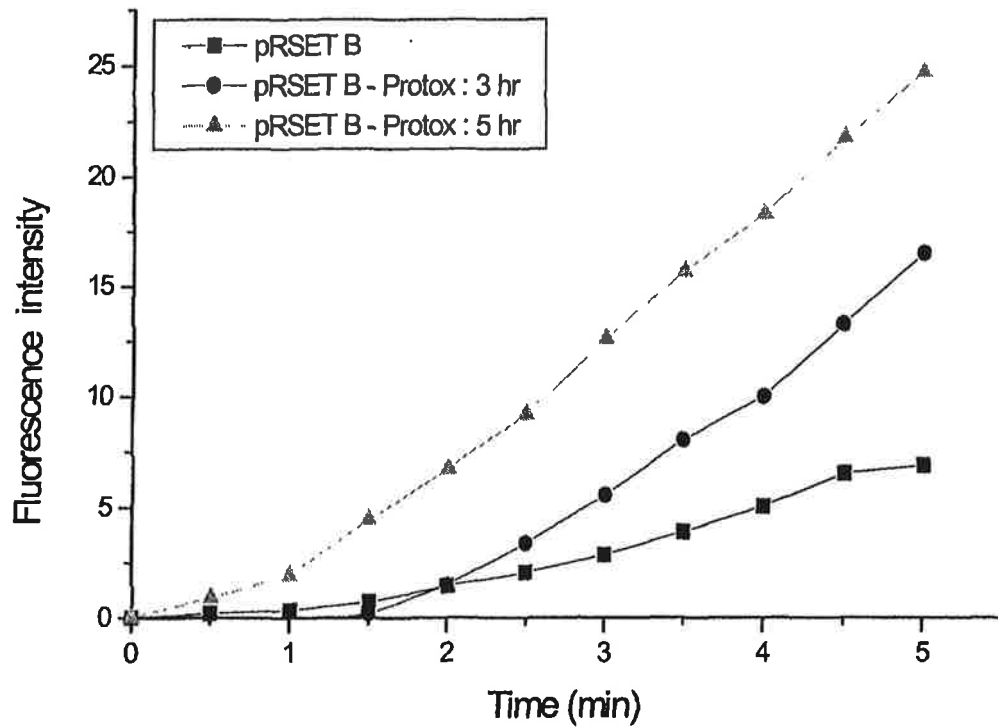


Fig. 2-25. Activity of pRSET B and pRSET B-Protox

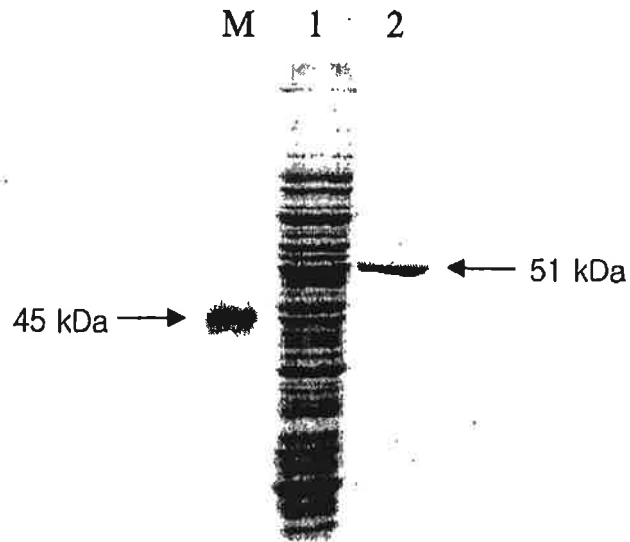


Fig. 2-26. SDS-PAGE of purified pRSET B-Prottox

M : Size marker
 1 : Solubilized cell extract
 2 : Purified pRSET B-Prottox

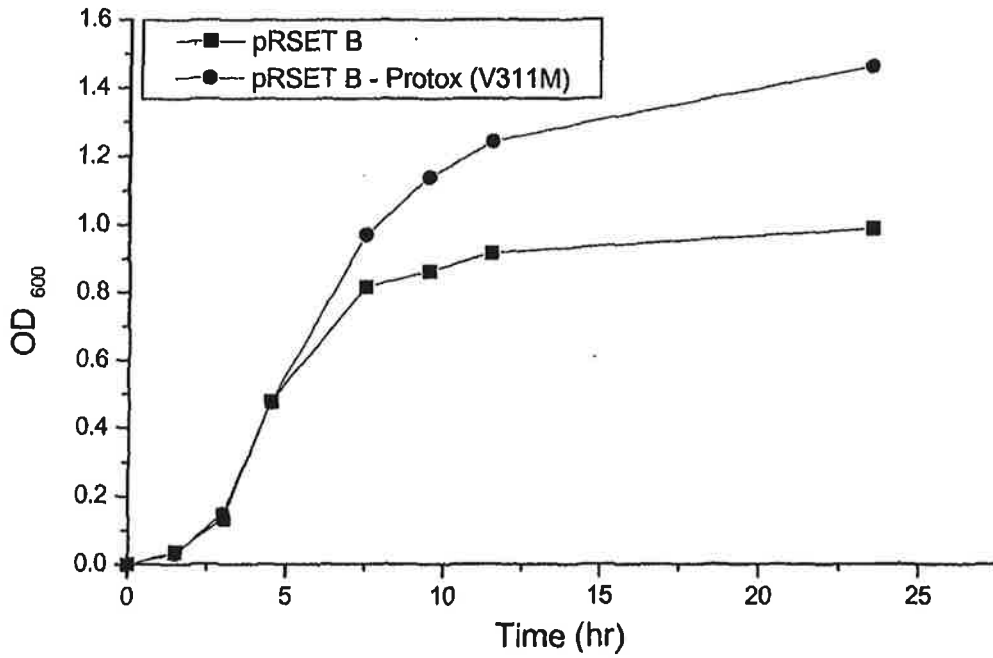


Fig. 2-27. Growth curve of BL21-gold(DE3)pLysS/pRSET B and BL21-gold (DE3)pLysS/pRSET B-Protox(V311M) at 30 °C. When a cell density of A₆₀₀ was 0.5, 1 mM IPTG was added.

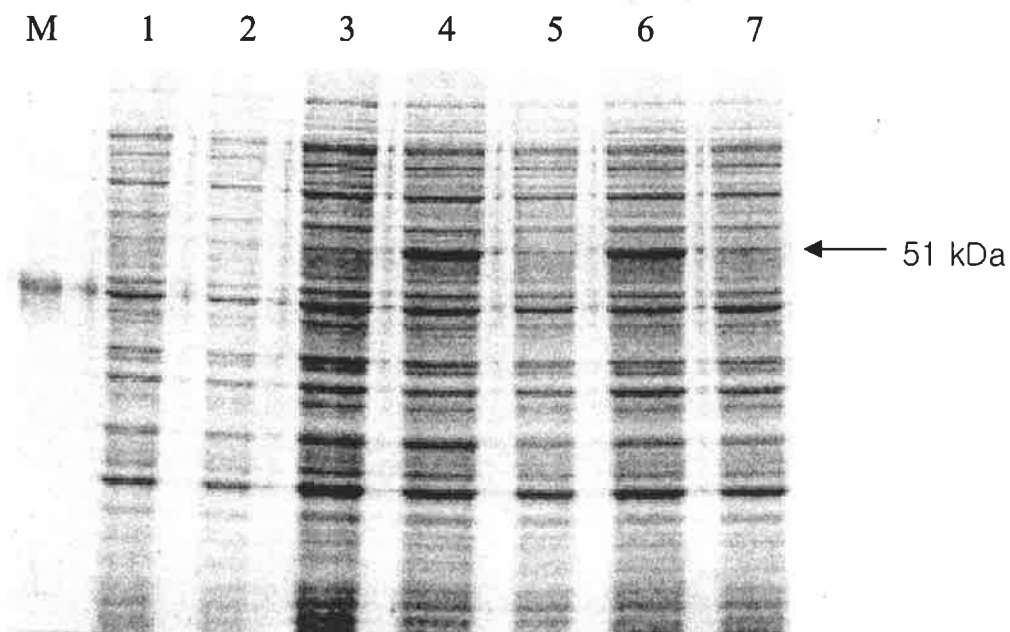


Fig. 2-28. SDS-PAGE of IPTG-induced pRSET B and pRSET B-Protox (V311M)

M : Size marker (45 kDa)

1 : 0 hr pRSET B

2 : 0 hr pRSET B-Protox(V311M)

3 : 3 hr pRSET B

4 : 3 hr pRSET B-Protox(V311M)

5 : 5 hr pRSET B

6 : 5 hr pRSET B-Protox(V311M)

7 : 7 hr pRSET B-Protox(V311M)

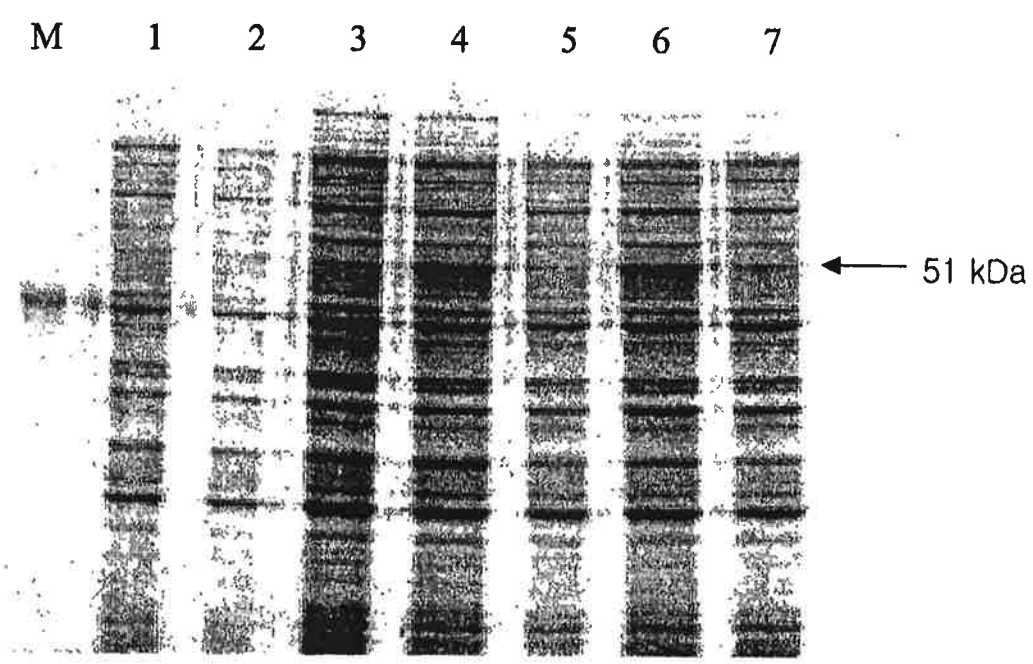


Fig. 2-28. SDS-PAGE of IPTG-induced pRSET B and pRSET B-Prottox (V311M)

- M : Size marker (45 kDa)
- 1 : 0 hr pRSET B 2 : 0 hr pRSET B-Prottox(V311M)
- 3 : 3 hr pRSET B 4 : 3 hr pRSET B-Prottox(V311M)
- 5 : 5 hr pRSET B 6 : 5 hr pRSET B-Prottox(V311M)
- 7 : 7 hr pRSET B-Prottox(V311M)

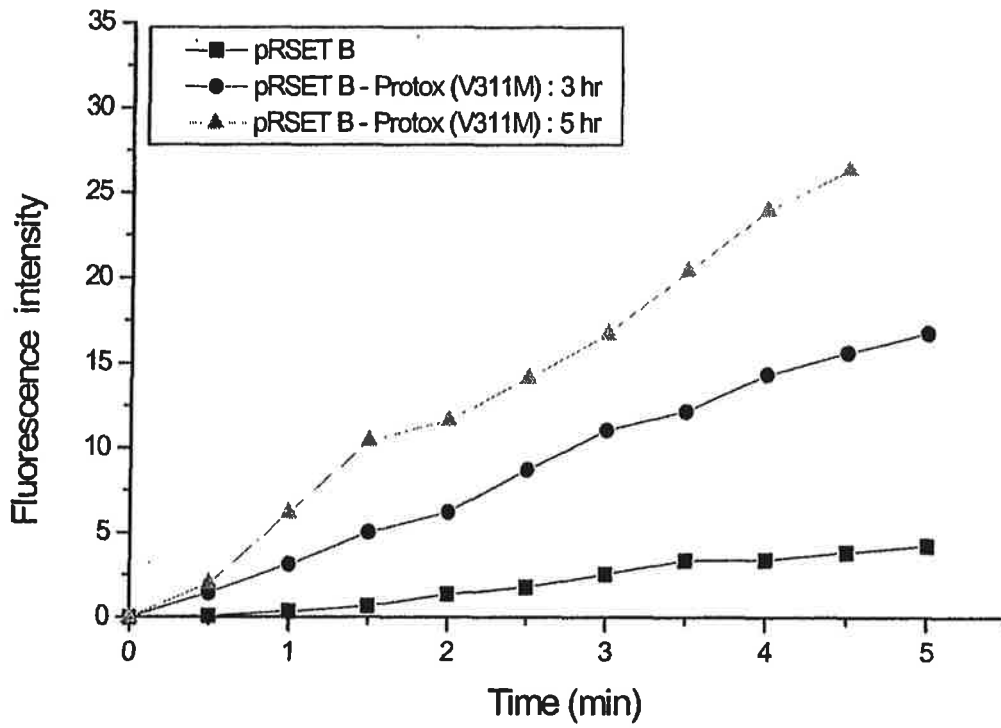


Fig. 2-29. Activity of pRSET B and pRSET B-Protox(V311M)

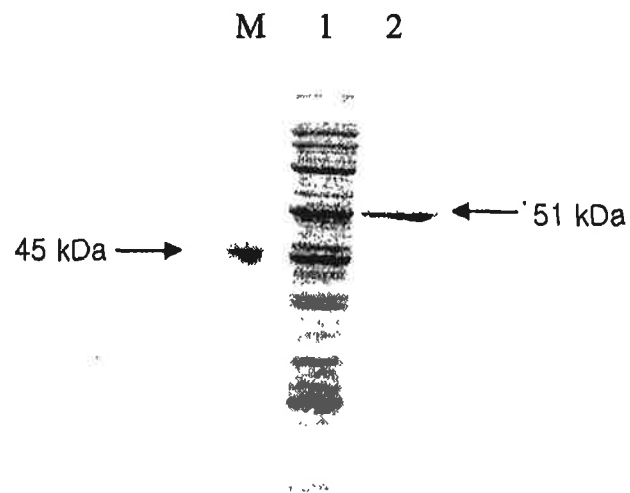


Fig. 2-30. SDS-PAGE of purified pRSET B-Protox(V311M)

M : Size marker

1 : Solubilized cell extract

2 : Purified pRSET B-Protox(V311M)

18. Wild type과 변이 Protox 효소의 특성 비교

Wild type과 V311M 변이 Protox 효소에 대하여 kinetic property를 비교 분석하였다. 기질의 농도에 대한 초기 속도는 wild type 과 변이 효소에서 모두 포화곡선을 나타냈다(Fig. 2-31). Oxyfluorefen은 두 효소에 대하여 competitive inhibitor로 작용하였으며, 얻어진 kinetic constant (Figs. 2-32, 33, 34, 35, 36)들을 Table 2-3에 나타냈다. Table 2-3에서 보는바와 같이 V311M 변이 효소의 Km, kcat, kcat/Km 값은 wild-type과 거의 동일하였으나, Ki 값은 wild type에 비하여 1.6 배 증가하였다. 이러한 결과는 V311M 변이가 효소의 구조나 촉매 기작은 변화시키지 않으면서, oxyfluorfen 제초제의 결합은 억제됨을 시사한다. 따라서 oxyfluorfen 저항성 작물의 육성에서 V311M 변이 Protox 유전자는 wild type의 Protx 유전자 보다 우수하다는 것을 입증하고 있다.

Table 2-3 Kinetic constants of wild-type and V311M mutant Protox

Protox	Km	kcat	kcat/Km	Ki
wild-type	3.19	14.01	4.41	11.00
V311M	3.00	12.85	4.28	17.73

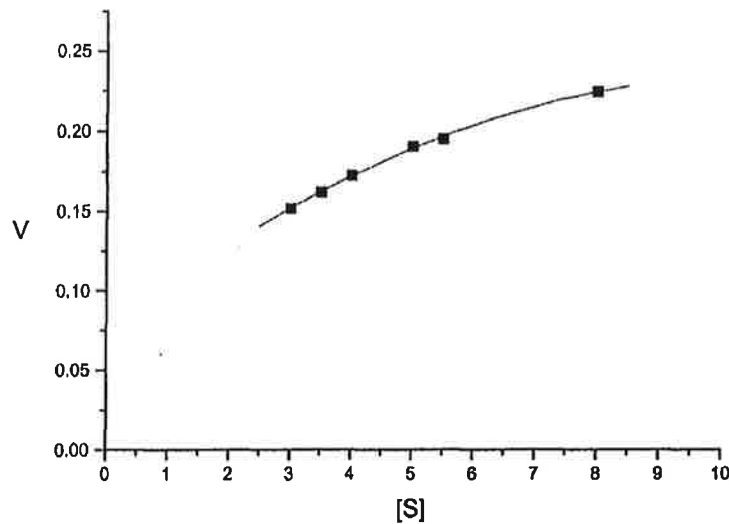


Fig. 2-31. Saturation curve of purified pRSET B-Protox

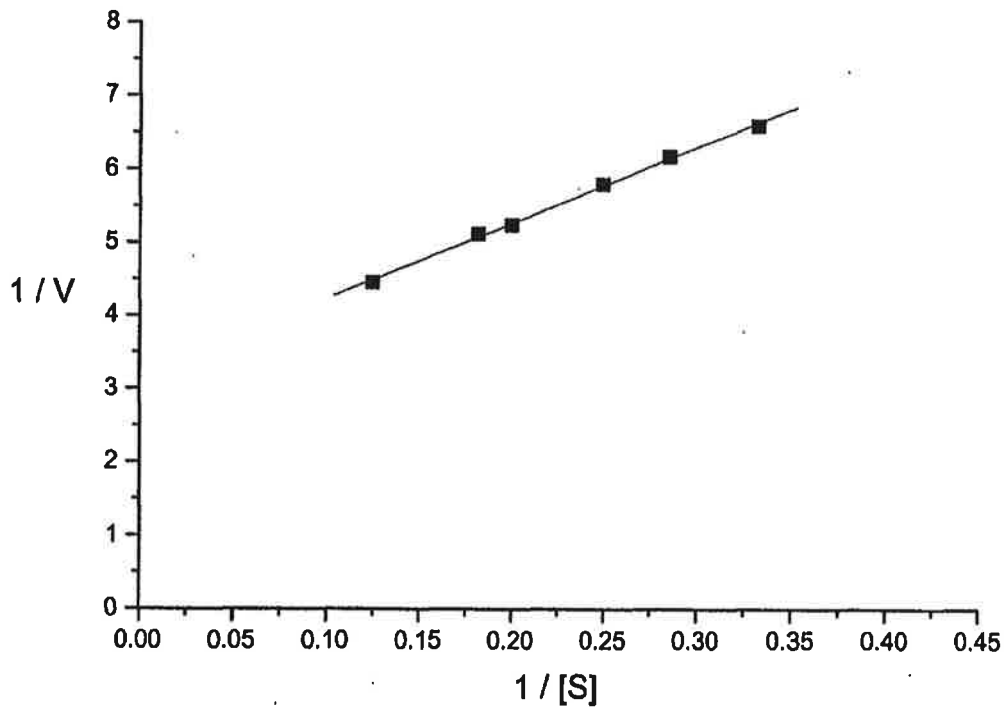


Fig. 2-32. Lineweaver-Burk plot of purified pRSET B-Prottox

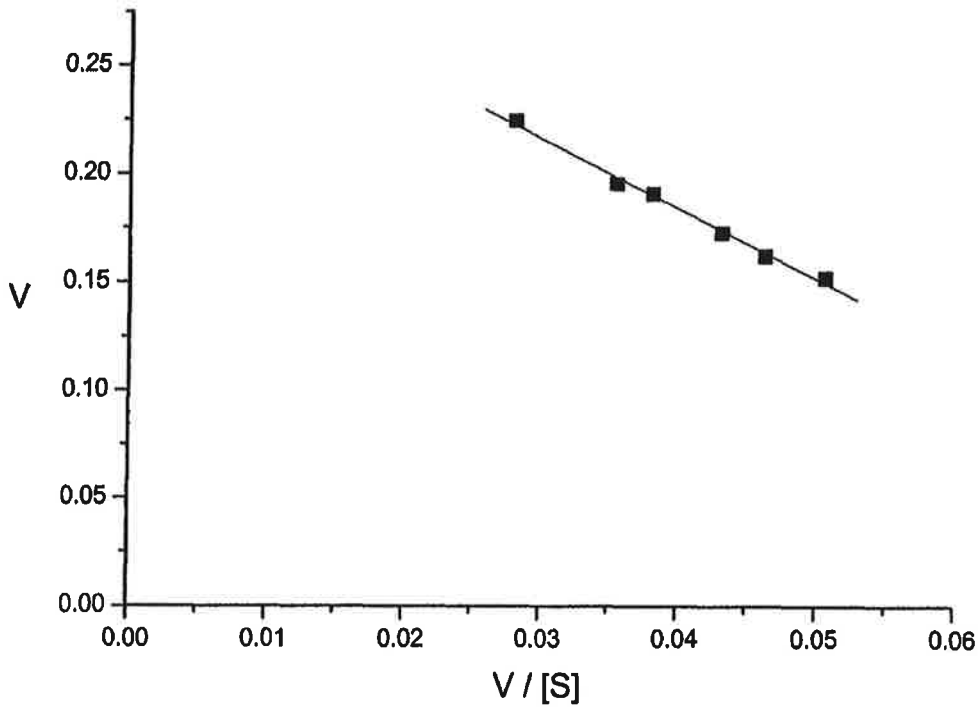


Fig. 2-33. Eadie-Hofstee plot of purified pRSET B-Protox

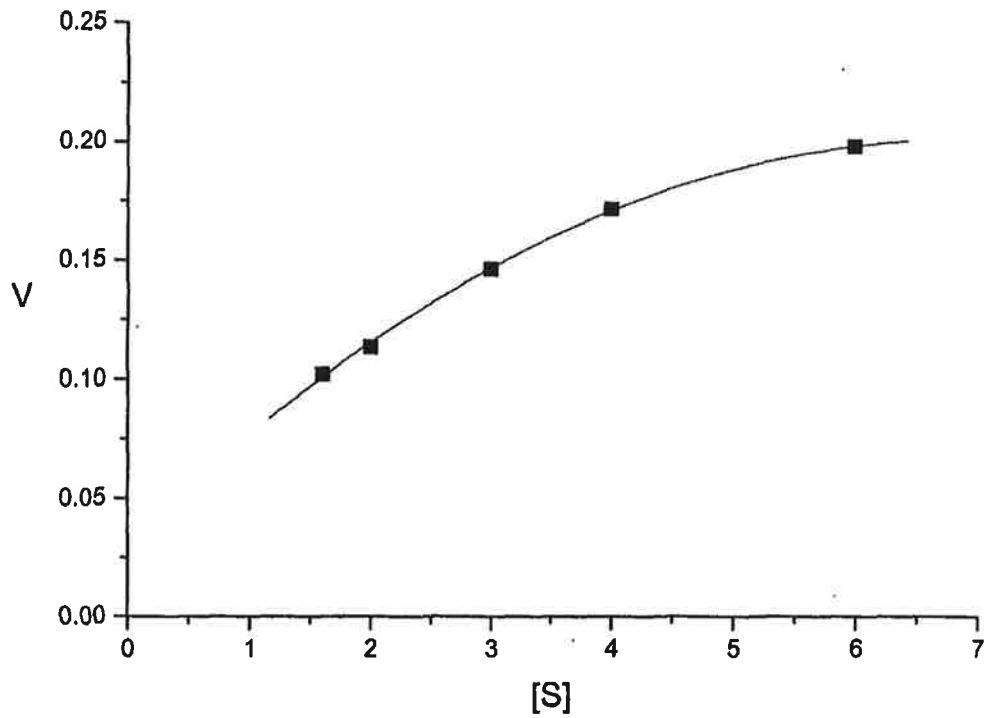


Fig. 2-34. Saturation curve of purified pRSET B-Protox(V311M)

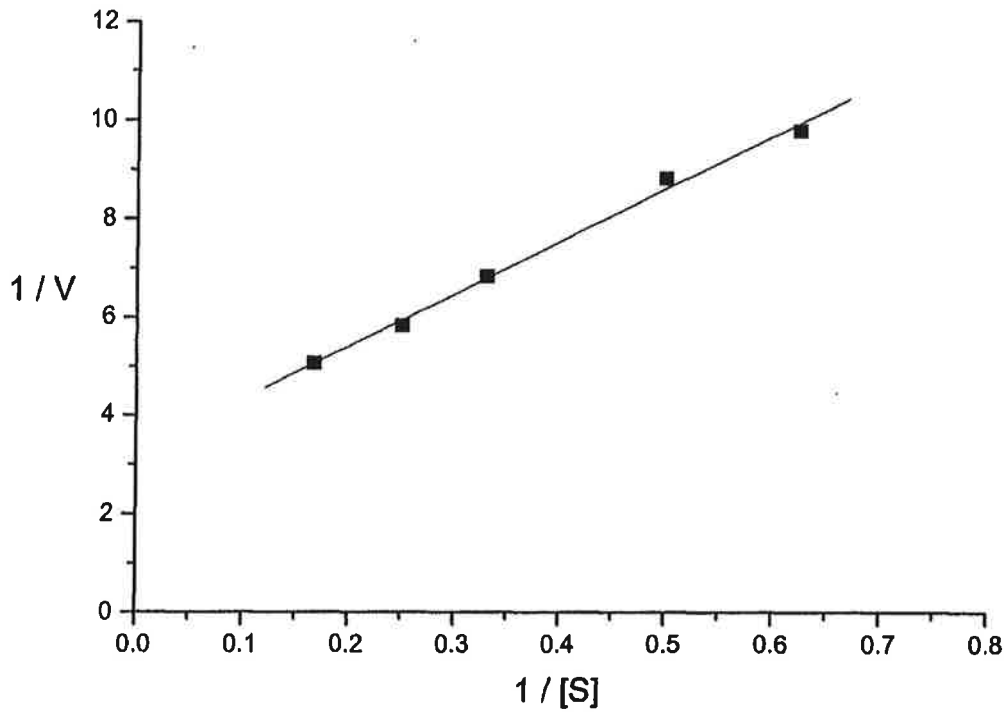


Fig. 2-35. Lineweaver-Burk plot of purified pRSET B-Prottox(V311M)

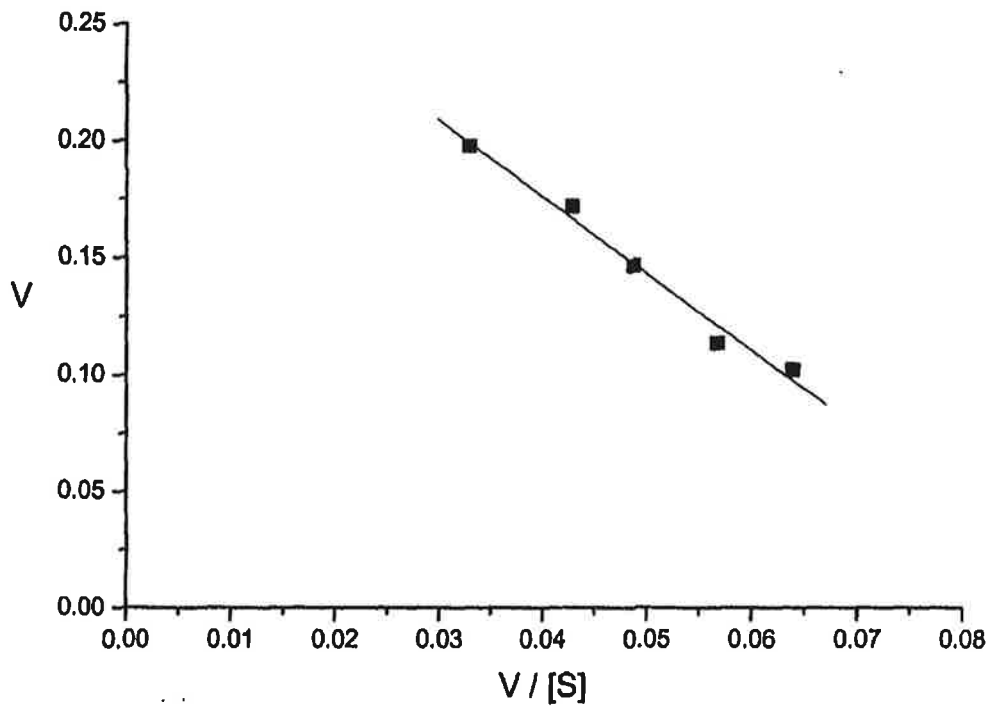


Fig. 2-36. Eadie-Hofstee plot of purified pRSET B-Protox(V311M)

제 4 절 결과요약

Heme과 chlorophyll의 생합성이 분지되는 중착점에 존재하는 Protoporphyrinogen oxidase (Protox)는 oxyfluorfen을 비롯한 많은 종류의 diphenyl ether계 제초제의 작용점이다. 제초제의 생화학적 작용기작은 plastid에 존재하는 Protox 효소가 제초제에 의하여 competitive inhibition에 의하여 활성이 저해됨으로서 기질인 Protogen IX 이 축적되고, 축적된 기질이 세포질을 지나서 plasma membrane에 도달하여 광활성 물질인 Proto IX으로 산화됨으로서 산소와 빛의 존재하에서 지질의 과산화를 유도함으로써 식물세포가 파괴된다고 알려져 있다.

1) *B. subtilis* Protox 반응의 특성 규명

대부분의 진핵생물체에서 유래된 Protox는 diphenyl ether계 제초제에 의하여 활성이 크게 저해 받는다. 반면에 *B. subtilis* Protox는 diphenyl ether계 제초제에 대하여 덜 민감하게 반응한다. 이러한 효소 유래된 생물체의 종에 따른 제초제에 대한 민감도가 다른 원인을 이해하기 위하여 *B. subtilis* Protox를 대장균에서 발현시켜서 대량생산하고 정제하였으며, 효소적 성질과 그 특성을 규명하였다. *B. subtilis* Protox 효소는 FAD를 조효소로 요구하였으며, *n*-octylglucopyranoside와 같은 detergent에 의하여 활성이 증가됨을 알 수 있었다. Protogen IX의 산화 반응의 속도를 기질의 농도에 따라 분석한 결과, Protgen IX의 산화 반응은 Fig. 1 과 같이 2 개의 중간체를 갖는 pre-equilibrium mechanism을 제시할 수 있었다.

2) Diphenyl ether계 제초제에 저항성을 나타내는 형질전환 식물의 생산

Diphenyl ether계 제초제에 저항성을 나타내는 형질전환 식물을 생산하기 위하여 다른 세부과제와 협력하여 *B. subtilis* Protox 유전자를 담배와 벼에 형질전환 하였다. 얻어진 형질전환 식물들은 oxyfluorfen에 대하여 높은 저항성을 나타냈다. (Fig. 2)

3) 벼에서 oxyfluorfen 저항성을 판별하는 효율적인 방법의 개발

Diphenyl ether계 제초제에 대한 저항성을 판별기 위한 현존하는 방법으로 leaf disc assay 방법을 들 수 있다. 그러나 이 방법은 대상 식물체를 파괴하여야하고, 식물체가 상당히 자란 후에 가능하다. 본 연구에서는 *B. subtilis* Protox 유전자를 도입시킨 형질전환 벼를 재료로하여 종자의 발아 속도와 유묘의 mortality를 분석함

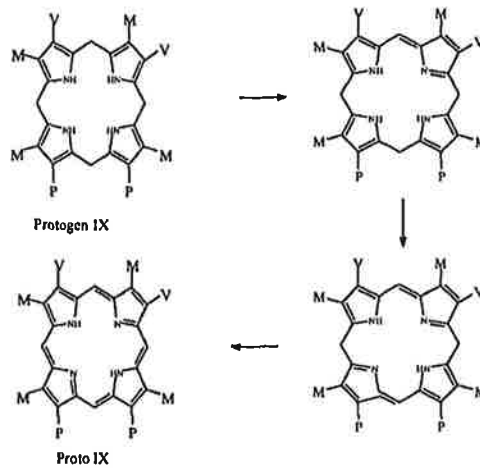


Fig. 1. Structures of proposed intermediates in the oxidation of Protogen IX (Han *et al.*, J. Biochem. Mol. Biol. 34 (1), 39-42, 2001).

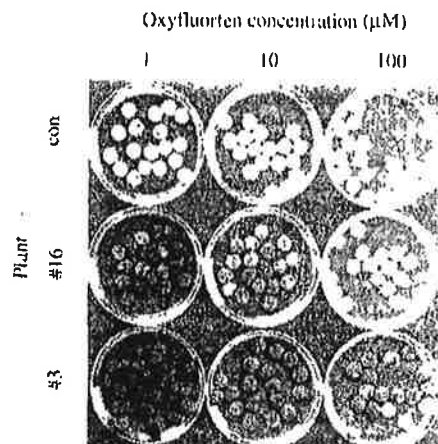


Fig. 2. Oxyfluorfen resistance of transgenic tobacco expressing *B. subtilis* Protox gene (Han *et al.*, Biosc. Biotech. Biochem., 62 (3), 558-560, 1998).

으로서 oxyfluorfen에 저항성인 개체를 편리하게 선별할 수 있는 방법을 개발하였다. Fig. 3 에 나타낸 바와 같이 유묘의 mortality는 지질의 과산화도와 잘 일치하였다. 따라서, 본 연구에서 개발된 방법은 oxyfluorfen에 저항성인 식물 개체를 선별하기 위하여 편리하고 신속하게 사용될 수 있을 것이다.

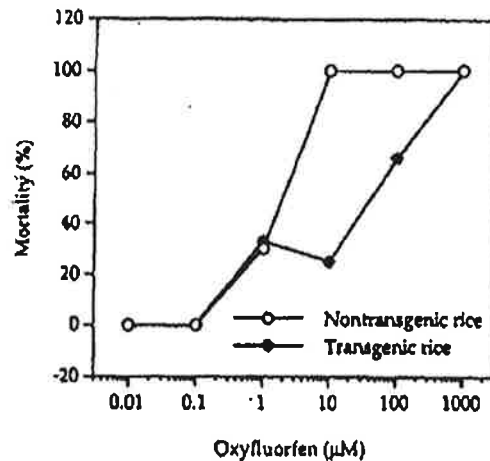


Fig. 3. Dependence of the mortality of seedlings of the nontransgenic and the transgenic rice plants on the concentration of oxyfluorfen (Han *et al.*, J. Pest. Sci. 25(2), 144-146, 2000).

4) *B. subtilis* Prottox의 V311M 변이는 oxyfluorfen에 대한 저항성을 증가시킨다.

B. subtilis Prottox의 Val-311을 Met으로 변이 시킨 후, V311M 변이 유전자를 대장균에서 발현시켜, V311M 변이 Protx 효소를 생산하고, 정제한 후, 효소적 성질과 촉매 기작을 wild type과 비교 분석하였다. 그 결과 Table 1에 나타낸 바와 같이, V311M 변이 효소의 Km, kcat, kcat/Km 값은 wild type과 거의 동일하였으나, Ki 값은 wild type에 비하여 1.6 배 증가하였다. 이러한 결과는 V311M 변이가 효소의 구조나 촉매 기작은 변화시키지 않으면서, oxyfluorfen 제초제의 결합은 억제됨을 시사한다. 따라서 oxyfluorfen 저항성 작물의 육성에서 V311M 변이 Prottox 유전자는 wild type의 Protx 유전자 보다 우수하다는 것을 입증하고 있다.

Table I Kinetic constants of wild-type and V311M mutant Prottox

Prottox	Km	kcat	kcat/Km	Ki
wild-type	3.19	14.01	4.41	11.00
V311M	3.00	12.85	4.28	17.73

제 5 절 참고문헌

- Akey WC and Machado VS. (1985) *Can. J. Plant Sci.* 65: 357-362.
- Akhtar M. (1991) In: *Biosynthesis of Tetrapyrroles* (Jordan, P. M. ed.) pp. 67-99, Elsevier Science Publishing, New York.
- Becerril JM and Duke SO. (1989) *Pestic. Biochem. Physiol.* 39: 119-126.
- Becerril JM and Duke SO. (1989) *Plant Physiol.* 90: 1175-1181.
- Buege JA and Aust SD. (1978) *Methods Enzymol.* 52: 302-310.
- Camadro JM, Ibrahim NG, and Levere RD. (1984) *J. Biol. Chem.* 251: 5678-5682.
- Camadro JM, Martinge M, Scalla R, and Labbe P. (1991) *Biochem. J.* 277: 17-21.
- Camadro JM, Thome F, Brouillet N, and Labbe P. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 32085-32091.
- Choi KW, Kuk YI, Han SU, Han O, Lee HJ, GuhJO. (1997) 16th APWSS, Kuala Lumpur, Malasia, 196-199.
- Choi KW, Han O, Lee HJ, Yun YC, Moon YC, Kim M, Kuk YI, Han SU, and Guh JO. (1998) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 558-560.
- Clark JM. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16: 9677-9686.
- Dailey HA and Karr SW. (1987) *Biochemistry* 26: 2697-2701.
- Dailey HA. (ed.) In: *Biosynthesis of Heme and Chlorophylls.* pp. 123-161, McGraw-Hill Publishing Co., New York.
- Dailey TA, Meisner P, and Dailey HA. (1994) *J. Biol. Chem.*, 269: 813-815.
- Duke SO, Lee HJ, Duke MV, Reddy KN, Sherman TD, Becerril JM, Matsumoto H, Jacobs NJ, and Jacobs JM. 1997. In: *Weed and Crop Resistance to Herbicides* (De Prado R, Jorrin J, and Garcia-Torres L, eds.). pp. 155-160. Kluwer, Dordrecht.
- Duke SO, Lydon J, Becerril JM, Sherman TD, Lehnen LP, and Matsumoto H. (1991) *Weed Sci.* 39: 465-473.
- Duke SO, Nandihalli UB, Lee HJ, and Duke MV (1994) *Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.*

- 559: 191-204.
- Eastin EF. (1971) *Weed Sci.* 19: 261-265.
- Finckh BF and Kunert KJ. (1985) *J. Agric. Food Chem.* 33: 574-577.
- Foyer CH, Lelandais M, and Kunert KJ. (1994) *Physiol Plant.* 92: 696-717.
- Frear DS, Swanson HR, and Mansager ER. (1983) *Pestic. Biochem. Physiol.* 20: 299-310.
- Girotti AW. (1990) *Photochem. Photobiol.* 51: 497-509.
- Han O, Kim O, Kim C, Park R, and Guh J. (1995), *Bull. Kor. Chem. Soc.* 16: .
- Haworth P and Hess FD. (1988) *Plant Physiol.* 86: 672-676.
- Higgins JM, Whitwell T, Corbin FT, Carter GE, and Hill HS. (1988) *Weed Sci.* 36: 141-145.
- Hiscox JD, Israelstam GF. (1979) *Can J. Bot.* 57: 1332-1334.
- Jacobs JM and Jacobs NJ. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* 229: 312-319.
- Jacobs JM and Jacobs NJ. (1987) *Biochem. J.* 244: 219-224.
- Jacobs JM and Jacobs NJ. (1993) *Plant Physiol.* 101: 1181-1187.
- Jacobs JM, Jacobs NJ (1982) *Enzyme* 28: 206-219.
- Jacobs JM, Jacobs NJ, and Duke SO. (1996) *Pestic. Biochem. Physiol.* 55: 77-83.
- Jacobs JM, Jacobs NJ, Borotz SF, and Guerinot ML (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* 280: 369-375.
- Jacobs JM, Jacobs NJ., Sherman TD, and Duke SO. (1991) *Plant Physiol.* 97: 197-203.
- Jacobs JM, Wehner JM, and Jacobs NJ. (1994) *Pestic. Biochem. Physiol.* 50: 23-30.
- Kappas A, Sassa S, and Anderson KE. (1983) In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease.* (Stanbury JB, Wyngaarden JB, Frederickson DS, Goldstein JL, and Brown MS, eds.), McGraw-Hill, New York. pp. 1301-1384.
- Kenyon WH, Duke SO, and Vaughn KC. (1985) *Pestic. Biochem. Physiol.* 24: 240-250.

- Kim CS, Lee HJ, Han O, Back K, Choi E, Guh JO, Chi YT, Lee DJ. (2000) *J. Pest. Sci.* 25(2), 144-146.
- Kim M, Kim C, Han S, Shin J, Ha H, Lee H, Guh J, Han O. (1997) *식물 환경과학의 발전 방향*, 2: 319-326.
- Klemm DJ and Barton LL. (1987) *J. Bacteriol.* 169: 5209-5215.
- Komives T and Gullner G. (1994) *Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.* 559: 177-190.
- Labbe-Bois R and Labbe P. (1990) In: *Biosynthesis of Heme and Chlorophylls* (Dailey HA. ed.) pp. 235-285, McGraw-Hill Publishing Co., New York.
- Lee HJ and Cho KY. (1996) *J. Photosci.* 3: 1-7.
- Lee HJ and Duke SO. (1994) *J. Agric. Food Chem.* 42, 2610-2618.
- Lee HJ and Duke SO. (1994) *J. Agric. Food Chem.* 42: 2610-2618.
- Lee HJ, Ball MD, and Rebeiz CA. (1991) *Plant Physiol.* 96: 910-915.
- Lee HJ, Ball MD, Parham R, and Rebeiz CA. (1992) *Plant Physiol.* 99: 1134-1140.
- Lee HJ, Duke MV, and Duke SO. (1993) *Plant Physiol.* 102: 881-889.
- Lee HJ, Duke MV, Birk JH, Yamamoto M, and Duke SO. (1995) *J. Agric. Food Chem.* 43: 2722-2727.
- Lee HJ, Lee SB, Chung JS, Han SU, Han O, Guh JO, Jeon JS, An G, Back K. (2000) *Plant Cell Physiol.* 41(6), 743-749.
- Marchuck D, Drumm M, and Saulino A. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19: 1154.
- Matringe M, Camadro JM, Block MA, Joyard J, Scalla R, Labbe P, and Douce R. (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 4646-4651.
- Matringe M, Camadro JM, Labbe P, and Scalla R. (1989) *Biochem. J.* 260: 231-235.
- Matsumoto H and Duke SO. (1990) *J. Agric. Food Chem.* 38: 2066-2071.
- Nandihalli UB, Duke MV, and Duke SO. (1992) *J. Agric. Food Chem.* 40: 1993-2000.
- Nandihalli UB, Duke MV, and Duke SO. (1992) *Pestic. Biochem. Physiol.* 43: 193-211.
- Nishimura K, Taketani S, and Inokuchi H. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 8076-8080.
- O'Brian MR, Kirshbom PM, and Maier RJ. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:

8390-8393.

- O'onor N, Mornet R, Matringe M, Clair D, Scalla R, Fujimoto TT, and Swithenbank C. (1992) *Bioorg. Med. Chem.* 2: 339-342.
- Pronprom T, Matsumoto H, Usui K, and Ishizuka K. (1994) *Pestic. Biochem. Physiol.* 50: 107-114.
- Proulx KL and Dailey HA. (1992) *Protein Sci.* 1: 801-809.
- Ramseier TM, Kaluza B, Studer D, Gloudemans T, Bisseling T, Jordan PM, Jones PM, Zuber M, and Hennecke H. (1989) *Arch. Microbiol.* 151: 203-212.
- Reddy KN, Nandihalli UB, Lee HJ, Duke MV, and Duke SO. (1995) *Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.* 589: 211-226.
- Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sasarman A, Chartrand P, Lavoie M, Tardif D, Proschek R, and Lapointe C. (1979) *J. Gen. Microbiol.* 113: 297-303.
- Sasarman A, Letowski J, Czaika G, Ramirez V, Nead MA, Jacobs JM, and Morais R. (1993) *Can. J. Microbiol.* 39: 1155-1161
- Sherman TD, Becerril JM, Matsumoto H, Duke MV, Jacobs JM, Jacobs NJ, and Duke SO. (1991) *Plant Physiol.* 97: 280-287.
- Siepkner LJ, Ford M, de Kock R, and Kramer S. (1987) *Biochem. Biophys. Acta*, 913: 349-358.
- Slater TF. (1984) *Methods Enzymol.* 105: 283-293.
- Smith AG, Marsh O, and Elder GH. (1993) *Biochem. J.* 292: 503-508.
- Taketani S, Kohno H, Okuda M, Furukawa T, and Tokunaga R. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 7527-7531.
- Taketani S, Nokahashi Y, Osumi T, and Tokunaga R. (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 19377-19380
- Taketani S, Yoshinaga T, Furukawa T, Kohno H, Tokunaga R, Nishimura K, and Inokuchi H. (1995) *Eur. J. Biochem.* 230: 760-765.

- Tischer W and Stortmann H. (1977) *Biochem. Biophys. Acta* 460: 113-125.
- Urban-Grimal D and Labbe-Bois R. (1981) *Mol. Gen. Genet.* 183: 85-92.
- Witkowski DA and Halling BP. (1989) *Plant Physiol.* 90: 1239-1242.
- Wright TR, Fuerst EP, Ogg AG, Nandihalli UB, and Lee HJ. (1995) *Weed Sci.* 43
47-54.

제 3 장 광활성 제초제에 대한 저항성 형질전환 작물 개발

제 1 절 서 설

Diphenyl ether계 제초제 중 하나인 oxyfluorfen은 자연상태에서 광분해가 이루어진다는 것과 소수성으로서 토양 중으로의 용탈이 적을 뿐 아니라, 극히 소량으로도 높은 제초활성을 가진다는 장점을 가지고 있다. 이와 같이 약제의 효율과 함께 환경 보호 측면에서도 유리한 제초제임에도 불구하고 비 선택성약제인 oxyfluorfen이 화본과 작물인 벼에 있어서는 약해를 보임으로써 그 사용범위가 제한되어 왔었다. 최근 분자생물학의 진보와 유전공학의 발달에 따라 유용한 외래유전자를 식물체로 도입하는 형질전환기법이 급격히 향상됨으로써 제초제 저항성 작물의 개발을 생각하게 되었고 몇몇 성공한 사례가 보고되고 있으며 유전자를 변형시킨 작물이 미국·유럽을 비롯한 몇몇 나라들에서 시판되고 있는 상태이다. 담배나 Arabidopsis등의 쌍떡잎 식물들에서 *Agrobacterium*을 이용한 고등식물들의 형질전환기법은 잘 정립되어 있으며 안정된 형질을 가진 많은 식물체들을 성공적으로 개발해왔다. 그러나 몇몇 경우를 제외하고 외떡잎 식물에서는 그 형질전환 효율이 매우 낮았다. Raineri(1990)등은 형질을 전환시킨 벼의 세포에서 neomycin-phosphotransferase(NPT)와 β -glucuronidase(GUS)의 활성을 확인함으로써 외떡잎식물에서의 형질전환의 가능성을 짐작케 하였다. 또한, Gould(1991)등은 *Agrobacterium*을 이용하여 옥수수의 지상부 액아 (shoot apices)로 NPT와 GUS유전자의 전이를 시킨 후 식물체를 재 분화시켰고, T₁세대에서 Southern분석을 통하여 유전자가 전이되었음을 확인한 바 있다. 그러나 *Agrobacterium*을 이용한 외떡잎식물에 있어서의 형질전환은 논란이 되어졌다. 그 예로 Potrykus(1990)는 여러 실험들에서 간과했던 것 중 하나가 실제 식물체의 게놈 내로 유전자가 전이된 것이 아니라 *Agrobacterium*과 공조배양 시 식물체 조직에 붙어 있던 *Agrobacterium*에 의한 발현가능성에 대한 보고를 한 바 있다. 따라서 본 연구에서는 형질전환체의 유전자의 확인을 위하여 PCR에 의한 분석결과보다는 Southern분석

을 통하여 게놈 내에 전이된 유전자만을 확인하였다. Chan(1993)등은 *Agrobacterium* 을 미성숙 배에 접종함으로써 몇 개의 형질전환변를 얻는데 성공하였으며, 후대검정을 하나의 식물체로만 했다는 단점은 있지만 Southern분석 결과 후대에 DNA가 유전된다는 것을 밝힌 바 있다. *Agrobacterium*을 이용한 효과적인 형질전환 기법들이 1994-1996년 사이에 보고되었는데, 미성숙 배처럼 왕성하게 분열하는 세포로 구성된 조직(callus)과 *Agrobacterium*의 virulence 유전자를 유도하는 acetosyringone을 첨가하여 공조배양을 하는 것이다. 또한 식물의 유전자형, 접종된 조직의 모양과 노화 정도, 벡터의 종류, 적당한 균주의 선택, 그리고 다양한 조건의 조직배양이 절대적으로 중요하다는 것도 밝혀졌다. 이제 *Agrobacterium*을 이용한 벼로의 외래 DNA 전이기술은 보편적인 것으로 응용되고 있다. *Asparagus officinalis* (Bytebier *et al.*, 1987), maize (Gould *et al.*, 1991; Citovsky *et al.*, 1994)등의 외떡잎식물에서 형질전환체의 개발이 이루어졌고, Hiei (1994)등에 의해 자포니카 계통의 벼에서도 쌍떡잎식물에서와 같은 수준의 형질전환율을 얻었다. 이로써 *Agrobacterium*을 이용한 외떡잎식물의 형질전환이 가능하게 된 것이다. 또한 수십 개의 Protox 유전자가 *Escherichia coli*, 인간, 효모, 그리고 여러 식물체들로부터 클론 되어졌고 특성이 규명되었다 (Lermontova *et al.*, 1997). 지금까지 규명된 모든 Protox들은 oxyfluorfen과 acifluorfen같은 DPE계 제초제에 의해 그 작용이 억제된다는 것이 밝혀졌으나 *Bacillus subtilis* Protox는 이러한 제초제에 억제를 받지 않는다는 것이 보고되었다 (Dailey *et al.*, 1994; Jacobs *et al.*, 1990).

따라서 본 실험에서는 지금까지의 논문들을 참고하여 세포질과 색소체 외막의 두 부위를 목표부위로 하여 벼의 게놈 내에서 *B. subtilis* Protox 유전자를 발현시킴으로써 DPE계 제초제인 oxyfluorfen에 저항성을 가지는 벼를 개발하고자 하였다.

제 2 절 연구 수행 방법

1. *B. subtilis* genomic library로부터 Protox 유전자 분리
- 가. Genomic library로부터 phage DNA 분리

*B. subtilis*의 genomic library는 Clontech사에서 구입하여 사용하였다. 10mL 액체 배양으로부터 lysate를 원심분리한 후 상정액을 취하여 lambda-TRAP (Clontech Co.) 을 처리하였고, phenol/chloroform(1:1)를 처리하여 phage DNA를 추출하였고, 에탄올 처리로 phage DNA를 분리하였다.

나. PCR을 통한 Protox 유전자의 증폭

Genomic library에서 분리한 phage DNA로부터 Protox를 암호화하고 있는 유전자를 증폭함과 동시에 염기서열 결정을 위하여 pGEN7Zf(+)의 *Hind*III 및 식물 발현 벡터를 위하여 pBI121의 *Bam*HI 인식부위에 클로닝할 수 있도록 primer를 설계하였고 DNA Thermal Cycler로 Protox 유전자를 증폭하였다.

다. Protox 유전자의 염기서열 결정

PCR에 의해 증폭된 DNA를 gel상에서 분획하고, 1.4kb의 절편을 전기용출로 순수 분리하여 *Hind*III로 절단하여 전기영동한 후 절편을 회수하였다. pGEN7Zf(+)를 *Hind*III로 절단한 후, 분리한 절편과 섞어 ligation한 후 DNA를 XL1-Blue로 도입하여 Sanger 등의 방법으로 염기서열을 결정하였다.

2. 담배의 형질전환

가. 식물 발현 벡터 클로닝

B. subtilis Protox 유전자인 증폭된 DNA를 *Bam*HI으로 절단하여 DNA 절편을 분리하였고, 식물 발현 벡터 pBI121도 *Bam*HI으로 절단하여 분획한 후 전기용출하여 벡터를 분리하였다. 1.4kb *Bam*HI DNA 절편을 *Bam*HI으로 절단한 식물 발현 벡터 pBI121에 클로닝하였다.

나. *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404의 transformation 및 형질전환체의 선별

B. subtilis Protox 유전자가 CaMV 35S promoter하에서 발현이 조절되므로 제조한 pBI121을 freeze-thaw방법 (An et al., 1988)으로 *A. tumefaciens* LBA4404에 도입하였다. 형질전환체를 선별하기 위하여 *A. tumefaciens* plasmid quick-screen 방법으로

각각의 DNA를 분리하였고 HindIII로 절단하여 transformation 여부를 확인하였다.

다. 담배 세포의 형질전환

담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi)의 형질전환에는 담배 종자를 표면 살균한 후 MS 기본배지에 치상하여 1개월 동안 생육시킨 잎 절편을 사용하였다. *B. subtilis* Protox 유전자가 도입된 *A. tumefaciens* LBA4404 균주와 담배 잎 절편을 공조배양한 후 MS 선발배지에서 치상하였고, 재 분화된 개체를 kanamycin 함유 배지에 치상하여 뿌리를 유도시킨 다음 이후의 실험 재료로 사용하였다.

라. 형질전환 식물체의 확인 및 T₁ 종자 확보

담배 형질전환체의 유전 분석은 PCR 방법, Southern blot 분석 및 Northern blot 분석을 통하여 형질전환체를 확인하였고, 형질전환이 확인된 개체를 생육시켜 각 clone들의 종자를 수확하여 타 세부과제의 재료로 제공하였다.

3. 벼의 형질전환

가. 식물 발현 벡터 선정 및 특성

벼의 형질전환용 벡터는 일반적으로 사용해 왔던 kanamycin selection은 벼의 분화 과정을 어렵게 하는 것으로 보고되어 형질전환용 벡터로 벼에 자주 사용하는 hygromycin selection을 사용하게 된다. 이 벡터(pGA1611)를 포항공대 안진홍 교수님으로부터 분양 받아 사용하였다. pGA1611은 13.5kb로서 Protox 유전자의 발현을 조절할 ubiquitin promoter가 탑재해 있으며, nopaline synthase 전사 종결 sequence가 3' 말단에 부착되어 있는 binary 벡터로서 유전자 조작 후 대장균에서 적정 재조합 DNA를 선별하기 위한 선발 마커인 tetracyclin 저항성 유전자가 포함되어 있다. 식물에로의 전이 부분인 T-DNA 영역에는 hygromycin 저항성 유전자가 있어 형질전환된 식물체만을 선별할 수 있도록 설계되어 있다.

나. pGA1611을 이용한 *B. subtilis* Protox:pGA1611 벡터 조작

*B. subtilis*의 Protox 유전자를 벼에 발현시키되 target site를 세포질에 발현시키

는 방법 및 plastid에 발현시키는 두 가지 방법을 기술적으로 사용하기로 하였다. 식물체에서 Protox가 plastid 외막에 존재하므로 똑같은 세포내의 위치에 *B. subtilis*의 Protox 유전자를 발현시키게 함으로 대사흐름 (metabolic flow)의 유연성을 기하기 위해 외부 Protox 유전자가 plastid에 이동하도록 transit sequence를 *B. subtilis* Protox 유전자 5' 말단에 융합(fusion)하였다.

다. *B. subtilis* Protox: pGA1611벡터의 *Agrobacterium*으로 형질전환

세포질 및 plastid에 발현되게끔 조작된 두 가지 형태의 pGA1611:Protox를 *Agrobacterium* strain LBA4404에 freeze and thaw 방법으로 형질전환을 하였다.

라. *Agrobacterium* 매개 방법에 의한 벼의 형질전환

벼의 형질전환 대상 숙주 (recipient)는 낙동벼의 배반(scutellum)으로부터 유도된 캘러스를 사용하였으며, Protox 유전자를 함유한 *Agrobacterium*을 log phase로 증식시킨 다음, 캘러스와 공조배양을 하였다. Hygromycin 및 cefotaxime이 함유된 N6 배지에서 형질이 전환된 캘러스를 선발하고, 선발된 캘러스를 MS 재 분화 배지에 옮겨 재 분화된 개체를 얻었다.

마. 재 분화된 형질전환 벼의 재배

재종을 위해 재 분화된 벼를 온실에 옮겨 생육시켰으며, 그 외 기본적인 생화학적 분석을 위해 3-4차 분얼경을 절개하여 사용하였다.

4. 형질전환체의 분자유전학적 분석

벼의 게놈 내에 *B. subtilis* 유전자가 존재하는지의 여부와 mRNA로의 전사가 이루어지는지를 확인하고자 T₀ 세대, T₁ 세대 및 T₂ 세대의 형질전환체를 대상으로 하여 Southern 분석과 Northern 분석을 실시하였다. 또한, *B. subtilis* Protox 폴리펩티드의 생성 유무를 알아보기 위해 *B. subtilis* Protox에 대항하여 만들어진 항체를 사용한 T₁ 세대의 형질전환체를 대상으로 하여 Western 분석을 수행하였다.

가. 형질전환체의 Southern 분석

Cytoplasm targeting line과 plastid targeting line 중 4개체를 선별하여 그들의 잎으로부터 게놈 DNA를 분리한 후 Southern 분석을 수행하였다. Phenol/chloroform 방법을 이용, 게놈 DNA를 분리하여 그 중 5 μ g를 각 개체로부터 취하였다. Digestion buffer가 시료에 잘 스며들도록 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 정도 배양한 뒤 DNA를 nylon membrane에 전이시킨 후 약 3시간 동안 hybridization buffer에 포화되도록 하였다. Stratagene Co.의 Prime It[®] Kit를 이용, random primer 방법으로 ³²P-dCTP 표지하여 membrane을 세척하고 이를 phosphoimaging analyzer로 분석하였다.

나. 형질전환체의 Northern 분석

게놈 DNA를 추출했던 동일한 계통의 잎을 액체질소를 이용하여 곱게 빻은 후 TRI[®] reagent를 사용하여 전체 RNA를 준비하였다. 이 중 15 μ g의 전체 RNA를 취하여 에탄올로 침전시킨 후 6.5% formaldehyde와 50% formamide가 함유된 10 \times Mops 완충액과 혼합하여 80 $^{\circ}$ C에서 3분간 변성시켰다. 변성된 시료를 1 \times Mops 완충액에서 0.8% formaldehyde agarose gel을 통하여 전체 RNA를 분리시켰다. 모세관 현상을 이용한 방법으로 전체 RNA를 nylon membrane에 전이시켜 P³²-dCTP로 표지한 다음, hybridization buffer에서 반응시켜 phosphoimaging analyzer로 분석하였다.

다. 형질전환체의 Western 분석

DNA와 RNA의 분석에 사용되었던 계통들의 포장에서 자란 T₁ 세대의 잎을 채취하여 곱게 빻은 다음 균질화 완충액 1mL로 시료를 균질화시켰다. 균질화된 시료를 두 겹의 Miracloth (CalBiochem, Co)로 여과시킨 다음 3,000g에서 10분간 원심분리하였다. 이후 상징액을 100,000g에서 10분간 원심분리하여 생긴 침전물을 100 μ L의 균질화 완충액으로 녹였다. 막 단백질의 면역 분석에 사용하기 위하여 20 μ g을 취했으며 세포질 단백질의 분석에는 15 μ g의 시료를 사용하였다. 두 종류의 단백질은 10% SDS-PAGE에서 분리시킨 후 PVDF membrane에 전이시켜 *B. subtilis* Protoc polyclonal 항체와 면역 반응을 시켰다. 2차 항체반응과 밴드의 감지는 enhanced chemiluminescence system으로 매뉴얼에 따라 수행하였다 (ECL kit; Boehringer Mannheim, Co).

5. 형질전환체의 oxyfluorfen 저항성 검정

가. Preemergence treatment 검정

B. subtilis Protox 유전자가 벼의 게놈 내에서 작동함을 보여 주었으므로 실제로 제초제를 처리하여 생육초기(발아시기)에서의 그 저항성 유무를 조사하였다. 유전 분석에 사용되었던 형질전환체와 비형질전환체의 T₁ 세대 종자를 표면 살균하여 1/2 MS 배지에 치상하였다. 배지에는 각각 0, 0.1, 1, 3 μM의 농도로 oxyfluorfen 용액을 첨가하였다. 또한 형질전환 종자에 남아 있을 *Agrobacterium*의 오염을 억제하기 위해 250mg/L의 cefotaxime을 함께 첨가하였다.

나. Postemergence treatment 검정

B. subtilis Protox 효소가 색소체에서 발현되며, 벼의 게놈 내에 서로 다른 copy 수로 존재하는 line들을 선발하여 식물체에 oxyfluorfen을 경엽처리하여 제초제에 접촉시킴으로서 그 저항성의 정도를 검정하였다. 유전분석에 사용되었던 형질전환체와 비형질전환체의 T₂세대 종자를 침종·최아하여 포트에서 재배하였다. 4주정도 자란 잎을 지름 0.5mm로 절단하였으며, 동일 개체의 서로 다른 잎에서 leaf disk를 무작위로 4개씩을 채취하여 반복간의 오차를 줄였다. 0, 100nM, 1 μM, 3 μM의 oxyfluorfen 용액이 담겨 있는 micro-petridish의 표면에 leaf disk를 띄워 제초제와 접촉되도록 하였으며, 암상태에서 하루동안 배양시켜 제초제가 잎 내부에 포화되도록 한 후, 광상태에 노출시켜 제초제의 활성을 유도하였다. 지속적인 광상태를 유지하며 일주일간 반응시킨 후, 잎의 피해정도를 육안으로 관찰하여 제초제에 대한 저항성 유무를 알아 보았다.

6. 형질전환 계통의 확보

독립된 형질전환 개체를 늘리기 위해 그 동안 확보해 두었던 T₁ 세대의 재분화 개체들을 상기의 Southern 분석과 동일한 방법으로 유전 분석하였다.

7. T₁ 종자의 hygromycin 분리 비율 측정

추가로 선발한 색소체 발현 T₁ 종자들의 종피를 제거 후 70% 에탄올 및 NaOCl을 사

용하여 표면 살균하였다. 선발배지는 hygromycin 50mg/L와 cefotaxime 250mg/L을 함유한 1/2MS 배지를 사용하였고, 암상태에서 26°C를 유지하여 생육시켰다. 치상 후 10 일째에 hygromycin에 의해 저해되지 않고 정상 생육하는 개체들의 수를 세어 transgene의 분리비를 조사하였다.

제 3 절 연구결과 및 고찰

1. 담배의 형질전환

가. *Bacillus subtilis* genomic library로부터 Protox 유전자 분리

10mL liquid culture ($10^{10} \sim 10^{11}$ pfu/ml)로부터 lysate를 50mL 원심분리 튜브로 옮겨서 2mL chloroform을 첨가한 후 섞고, 8000rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리하였다. 상정액을 취하여 50 μ L lambda-TRAP (Clontech Co.)을 처리하고, 얼음 위에 30분간 정치한 후, 8000rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리하여 상정액을 버리고 1mL SM buffer에 현탁하였다. 1.5mL 미량원심분리용 튜브로 옮겨 15,000rpm으로 1분간 원심분리한 후 1mL SM buffer에 현탁하였다. 이 과정을 2회 반복한 다음 pellet을 50 μ L TE-10 buffer에 현탁한 후, 70°C에서 5분간 열처리하고 15,000rpm에서 2분간 원심분리하였다. 이렇게 얻은 상정액에 동량의 phenol/chloroform(1:1)를 처리하여 phage DNA를 추출하였고 0.5배의 5M ammonium acetate와 2배의 에탄올로 DNA를 분리한 결과 양질의 phage DNA를 얻었다. *B. subtilis* genomic library로부터 전체 DNA 분리를 한 후 Protox 유전자를 증폭함과 동시에 염기서열 결정을 위하여 pGEM7Zf(+)의 *Hind*III 부위에 식물에서 발현시키기 위하여 pBI121, *Bam*HI 부위에 클로닝할 수 있도록 primer를 설계하여 PCR로 Protox 유전자를 증폭한 결과, 여러 크기의 밴드가 생성되었다 (Fig. 3-1). Agarose gel에서 분획한 1.4kb 크기의 증폭된 DNA 절편을 전기용출로 분리하여 다음 실험에 사용하였다.

나. PCR을 통한 Protox 유전자의 증폭

B. subtilis genomic library에서 분리한 phage DNA로부터 Protox를 암호화하고 있는 유전자를 증폭함과 동시에 pGEM7Zf(+) (Promega Co.)의 *Hind*III, 그리고 pBI121의

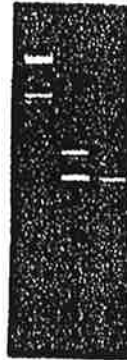


Fig. 3-1. Amplification of *B. subtilis* Protox from DNAs isolated from genomic library.

*Bam*HI 제한효소 인식부위에 클로닝할 수 있도록 primer를 설계하였다. 사용한 primer는 N-terminal primer로서 5'-GCCGAAGCTTGGATCCATGAGTGACCGCAAAAA-3'과 C-terminal primer로 5'-GCCGACTGGATCCGTTTGTAGCTGAATAAAT-3' 및 5'-GCCGTCTAGGTTTGTAGCTGAATAAAT-3'을 DNA synthesizer (Pharmacia Co.)를 이용하여 합성하였고, DNA Thermal Cycler (Cetus/Perkin-Elmer Co.)를 사용하여 denaturation (95°C, 1분), annealing(60°C, 1분), extension (72°C, 1분)을 30cycle로 하여 Vent™ DNA polymerase (NEB Co.)로 Protox 유전자를 증폭시켰다.

다. Protox 유전자의 염기서열 결정

PCR에 의해 증폭된 DNA를 0.8% agarose gel에서 분획하였고, 1.4kb의 절편을 단방향 전기용출(unidirectional electroelution)로 순수 분리한 후, 분리한 1.4kb 절편을 *Hind*III로 절단하여 3% low melting agarose (FMC Co.)로 전기영동하여 절편을 회수하였다. pGEM7Zf(+)를 *Hind*III로 절단한 후, 분리한 1.4kb 절편과 섞어 T₄ DNA ligase로 ligation한 후, ligation한 DNA를 XL1-BLUE로 도입하여 콜로니를 선별하였고 dideoxynucleotide chain termination 방법 (Sanger et al., 1977)으로 염기서열을 결정하였다. 분리한 plasmid를 alkali denaturation방법으로 single strand를 만들고 primer로는 SP6 primer, T7 primer를 사용하여 Sequenase (USB Co.)로 pGEM7Zf(+)에 클로닝된 DNA의 염기서열을 결정하였다. PCR에 의해 증폭된 DNA를

*Hind*III로 절단한 pGEM7Zf(+)에 클로닝하여 얻은 plasmid를 pBG14라 명명하였다. pBG14을 *Hind*III로 절단한 후 agarose gel에서 전기영동 한 결과 1.4kb의 절편을 볼 수 있었다. 클로닝된 1.4kb 절편이 *B. subtilis* Protox를 암호화하고 있는 유전자인지 알아보기 위하여 dideoxy chain-termination 방법으로 염기서열을 결정하였다. 분리한 plasmid를 alkali denaturation 방법으로 single strand를 만들고 primer로는 SP6 primer, T7 primer를 사용하여 증폭한 DNA의 염기서열을 결정한 결과, 이미 보고된 유전자의 염기서열(Hansson et al., 1992)과 몇 개의 염기를 제외하고 동일하였다 (Fig. 3-2).

라. 식물 발현 벡터 제조

1) 식물 발현 벡터 클로닝

선별된 Protox 유전자를 식물체에서 발현시키기 위하여 식물발현 벡터를 제조하였다. 증폭된 DNA를 0.8% agarose gel에서 분획한 다음, 단방향 전기용출로 elution하였다. Elution한 DNA를 *Bam*HI으로 절단하고 3% low melting agarose gel에 전기영동하여 DNA절편을 분리하였다. 식물 발현벡터 pBI121도 *Bam*HI으로 절단하여 0.8% agarose (FMC Co.) gel에서 분획한 다음, 단방향 전기용출로 벡터를 분리하였다.

1.4kb *Bam*HI DNA절편을 *Bam*HI으로 절단한 식물 발현벡터 pBI121에 클로닝하였다 (Fig. 3-3). 이 벡터를 pBP12로 명명하였다.

2) *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404의 transformation 및 transformant의 선별

B. subtilis Protox 유전자가 CaMV 35S promoter하에서 발현이 조절되도록 제조한 식물 형질전환용 발현벡터 pBP12을 *A. tumefaciens* LBA4404로 transformation하기 위하여 freeze and thaw 방법(An et al., 1988)을 사용하였다. pBP12가 도입된 *A. tumefaciens* LBA4404를 선별하기 위하여 *Agrobacterium* plasmid quick-screen 방법(An et al., 1988)으로 각각의 DNA를 분리하고, *Hind*III로 절단하여 transformation 여부를 확인한 결과, Fig. 3-4에서 나타난 바와 같이 성공적으로 도입되었음을 확인하였다. 식물 발현벡터의 도입이 확인된 *Agrobacterium*을 담배세포의 형질전환에 사용하였다.

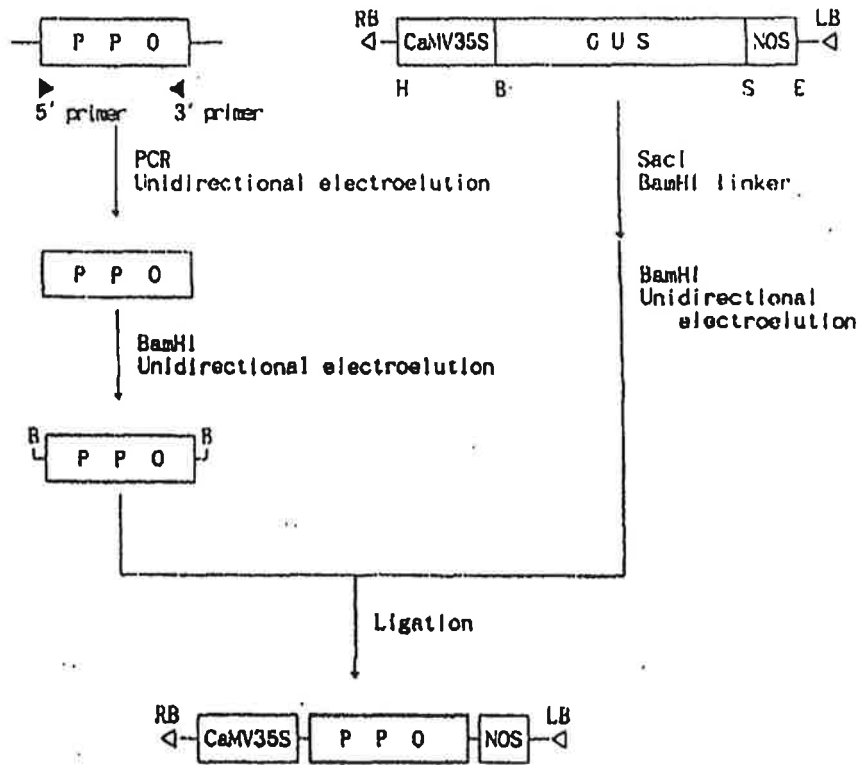


Fig. 3-3. Structure of the CaMV 35S-Protox chimeric gene. In order to express the Protox gene in tobacco cells, a chimeric gene between the CaMV 35S promoter and Protox was constructed. LB, the left border of Ti-plasmid; NPTII, neomycin phosphotransferase II; Protox, protoporphyrinogen oxidase of *B. subtilis*, the promoter of the nopaline synthase gene; RB, the right border of Ti-plasmid; NOS, the terminator of the nopaline synthase gene; B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; S, *Sac*I.

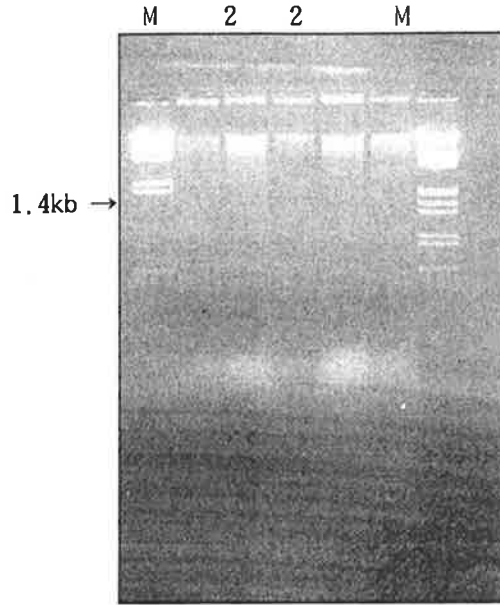


Fig. 3-4. Agarose gel electrophoresis of pBP12 was digested with *Hind*III in 0.8% agarose gel; Lane 2: transformant of pBP12, M: Size marker.

마. 담배세포의 형질전환

담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) 세포의 형질전환에는 담배 종자를 70% 에탄올에 30초간 처리한 후 50% 상업용 표백제에 10분간 침적하여 표면 살균하고 멸균된 증류수로 3회 세척하여 MS기본배지 (Murashige & Skoog, 1962)에서 발아시켰다. 성장상에서 1개월 동안 생육시킨 잎을 적당한 크기로 잎절편을 만들어 담배 세포의 형질전환용 재료로 사용하였다. pBP12을 지니고 있는 *A. tumefaciens* LBA4404는 LB배지에서 28°C, 200rpm으로 18시간 진탕배양하여 담배의 형질전환에 사용하였다. 담배 잎절편을 pBP12을 지니고 있는 *A. tumefaciens* LBA4404 균주 용액에 30분간 처리하여 접종한 후, 1.0mg/L BAP와 0.1mg/L NAA를 첨가한 MS 고형배지에 치상하여 26°C, 암소에서 48시간 공조배양하였다. 공조배양 후 1.0mg/L BAP, 300mg/L carbenicillin과 100mg/L kanamycin을 첨가한 MS 선발배지에 치상하여 shoot를 유도한 결과 배양 2주 후부터 shoot가 분화되었다. 유도한 shoot를 100mg/L kanamycin이 첨가된 MS 기본배지에 옮겨 뿌리를 유도한 결과 배양 10일 후 뿌리가 형성되었다. 배양 조건은 온도가 26°C, 광도는 3000Lux, 일장은 16시간 주기로 하였다. 뿌리가 유도된 개체는 포트

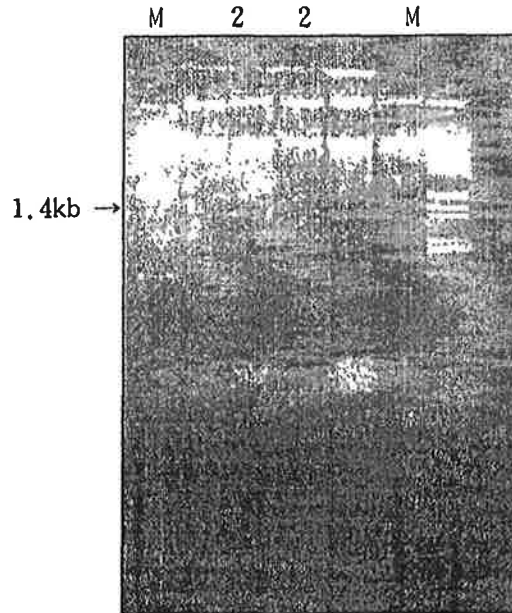


Fig. 3-4. Agarose gel electrophoresis of pBP12 was digested with *Hind*III in 0.8% agarose gel; Lane 2: transformant of pBP12, M: Size marker.

마. 담배세포의 형질전환

담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) 세포의 형질전환에는 담배 종자를 70% 에탄올에 30초간 처리한 후 50% 상업용 표백제에 10분간 침적하여 표면 살균하고 멸균된 증류수로 3회 세척하여 MS기본배지 (Murashige & Skoog, 1962)에서 발아시켰다. 성장상에서 1개월 동안 생육시킨 잎을 적당한 크기로 잎절편을 만들어 담배 세포의 형질전환용 재료로 사용하였다. pBP12을 지니고 있는 *A. tumefaciens* LBA4404는 LB배지에서 28°C, 200rpm으로 18시간 진탕배양하여 담배의 형질전환에 사용하였다. 담배 잎절편을 pBP12을 지니고 있는 *A. tumefaciens* LBA4404 균주 용액에 30분간 처리하여 접종한 후, 1.0mg/L BAP와 0.1mg/L NAA를 첨가한 MS 고품배지에 치상하여 26°C, 암소에서 48시간 공조배양하였다. 공조배양 후 1.0mg/L BAP, 300mg/L carbenicillin과 100mg/L kanamycin을 첨가한 MS 선발배지에 치상하여 shoot를 유도한 결과 배양 2주 후부터 shoot가 분화되었다. 유도한 shoot를 100mg/L kanamycin이 첨가된 MS 기본배지에 옮겨 뿌리를 유도한 결과 배양 10일 후 뿌리가 형성되었다. 배양 조건은 온도가 26°C, 광도는 3000Lux, 일장은 16시간 주기로 하였다. 뿌리가 유도된 개체는 포트

로 이식하여 순화시킨 다음 유전자분석과 제초제 저항성 검정에 사용하였다.

바. 담배의 형질전환 여부 확인 및 T₁ 종자 확보

1) PCR 분석

형질전환된 담배로부터 전체 DNA를 추출하고, PCR 방법으로 Protox 유전자가 담배의 genome내로 도입되었는지 알아보았다. N-terminal primer로 5'-GCCGAAGCTTGGATCC ATGAGTGACCGCAAAA-3'과 C-terminal primer로 5'-GCCGAAGCTTGGATCCGTTTGTAGCTGAATAAAT-3'을 DNA synthesizer (Pharmacia Co.)를 이용하여 합성하고, DNA Thermal Cycler (Cetus/Perkin-Elmer Co.)를 사용하여 denaturation (95°C, 1분), annealing (60°C, 2분), extension (72°C, 2분)을 40 cycle로 하여 VentTM DNA polymerase (NEB Co.)로 도입된 Protox 유전자를 증폭하였다. PCR 방법으로 도입된 Protox 유전자를 증폭한 후 증폭된 1.4kb Protox 절편을 DIG-labelling & detection kit (B.M Co.)을 이용하여 labelling하고 탐침으로 사용하여 표준 방법으로 Southern blot을 수행하였다. 이 결과, 대부분의 형질전환된 담배에서 1.4kb절편이 증폭되었음을 확인하였다. 한편 형질전환 담배로부터 PolyAtract system 1000 (Promega Co.)을 이용하여 mRNA를 분리하고 GeneAmp RNA PCR kit (Perkin Elmer Co.)로 RT-PCR을 수행하여 형질전환된 담배에서 도입된 *B. subtilis* Protox 유전자가 mRNA 수준에서 발현되는지 확인하였다.

2) Northern 분석

도입된 Protox 유전자가 발현되는 형질전환 담배를 RT-PCR로 확인한 후, 5µg poly(A)⁺ RNA를 10% formaldehyde가 함유된 1% agarose gel에서 전기영동한 다음 Hybond-N+ nylon membrane으로 옮기고 ³²P-dATP로 표지된 1.4kb HindIII 절편을 탐침으로 사용하여 Northern blot을 수행하였다. 이 결과 클론 3과 16에서 단일전사체가 보였으나 형질전환이 되지 않는 담배에서는 이 전사체가 보이지 않았다 (Fig. 3-5).

따라서 담배세포로 도입된 *B. subtilis* Protox가 적어도 mRNA 수준에서 발현됨을 확인할 수 있었다. 또한 Fig. 3-5에서 나타난 바와 같이 클론 3이 클론 16보다 발현량이 상대적으로 훨씬 높음을 알 수 있었다.

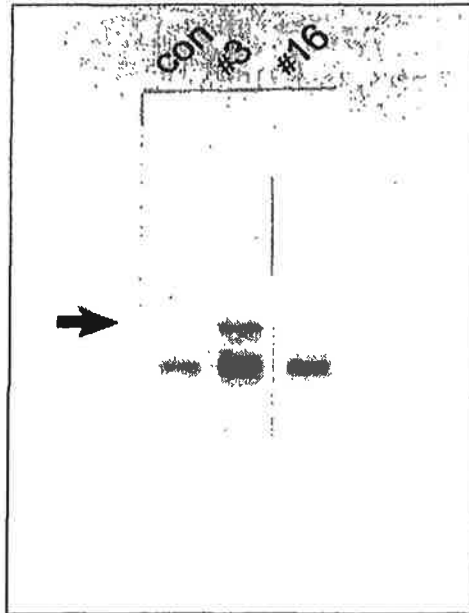


Fig. 3-5. Northern blot analysis. Poly(A)⁺ RNAs were isolated from transgenic tobacco plants, separated on 1% agarose gel containing 10% formaldehyde, and transferred to nylon membrane. The filter was probed with ³²P-labeled 1.4kb *Hind*III fragment of *B. subtilis* Protox gene. Lane 1, nontransgenic tobacco plant; Lane 2, transgenic tobacco plants.

3) T₁ 종자 확보

B. subtilis Protox 유전자 도입이 확인된 담배 개체는 온도가 26℃, 광도는 3000Lux, 일장은 16시간 주기로 하여 성장상에서 생육시킨 후 자가수분조건에서 각 clone의 종자를 수확하였다.

2. 벼의 형질전환

가. Transit sequence의 PCR cloning 작업

B. subtilis Protox 유전자를 plastid에 발현시키기 위해 이 유전자의 산물을 plastid로 이동시켜 주는 transit sequence가 필요하게 된다. Transit sequence는 GenBank database에서 확인한 담배의 Protox 유전자로부터 획득하였다. 담배(KY160)의 Protox 유전자를 transit sequence 부분의 PCR primers{forward primer

5'-d(TATCAAGCTTATGACAACAACCTCCCATC)-3', a reverse primer 5'-d(ATTGGAGCTCGGAGCATC GTGTTCTCCA)-3')을 디자인한 후 담배의 genomic DNA를 template로 사용, PCR를 수행한 결과, 190bp 정도의 DNA가 증폭됨을 확인하였으며 이 증폭된 DNA를 *HindIII/SacI* 제한효소로 양쪽 끝을 절단 후 *HindIII/SacI* 제한효소 개봉된 pBluescript내로 subcloning하여 이 insert가 함유된 plasmid를 Qiagen plasmid kit로 정제 후 T3 및 T7 primer를 이용하여 sequence한 결과는 다음과 같다 (Fig. 3-6).

```
ATGACAACAACCTCCCATCGCCAATCATCCTAATATTTTCACTCACCGGTCACCGCGTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCT
CCTCCTCCTCGTCTCCATCGGCATTCTAACTCGTACGAGTTTCTCCCTTTCTCTTCCATCTCGAAGCGCAATAGTGT
CAATTCGAATGGCTGGAGAACACGATGCTCCGAGCTC
```

Fig. 3-6. 담배로부터 PCR cloning된 담배 Protox 유전자의 transit sequence.

이 sequence는 보고된 담배의 sequence 정보와는 다소 상이하며 이를 전이시켜 본 결과 문헌에 보고된 sequence와 약간 다른 serine 아미노산의 긴 배열이 등장하지만 (Fig. 3-7), 이는 본 연구에 사용한 품종 (KY160)과 다르기 때문인 것으로 생각되었다(Samsun). 그러나 transit sequence로서의 필요한 조건이 충족되므로 이 transit sequence를 *B. subtilis*의 Protox 유전자를 plastid로 target시키기 위한 transit sequence로 사용하였다.

```
PCR 1 MTTTPIANHPNIFTHRSPPSSSSSSSSSSSAFLTRTSFLPFSSISKRNSVNSNGWRTRCS 63
Samsun 1 MTTTPIANHPNIFTHQSSSSPLAFLNRTSFIPFSSISKRNSVNCNGWRTRCS 52
```

Fig. 3-7. 담배로부터 PCR cloning된 transit sequence의 아미노산 비교.

나. pGA1611을 이용한 *B. subtilis* Protox: pGA1611 벡터 조작

B. subtilis Protox 유전자가 들어 있는 pBluescript를 template로 사용하여 PCR 기법으로 *B. subtilis* Protox 유전자를 증폭하였다. 사용한 forward primer는 5'-GCTGGAGCTCATGAGTGAC GGCAAAAAC-3'이며 subcloning을 위한 *SacI* 제한효소 site가 도입되었으며 *B. subtilis* Protox 유전자의 전이 개시 지점인 ATG site가 있음을 볼

수 있다. Reverse primer는 5'-ATTGGGTACCTTAGCTGAATAAATAGGT-3'을 제작 사용하였으며 전이 종결 site (TAA)가 있고 제한효소 *KpnI* site가 내재되어 있다. 이 두 primer를 이용하여 PCR 증폭한 다음 제한효소 *SacI/KpnI*을 이용하여 양쪽 끝을 절단하고 같은 효소로 절단한 pGA1611 벡터에 ligation하였다. Transit sequence가 있는 Protox 유전자는 transit sequence를 상기의 primer를 사용하여 PCR 증폭한 후 *HindIII/SacI*으로 양쪽 끝을 자른 다음 이 transit sequence DNA 단편과 *B. subtilis* Protox 유전자 단편을 함께 *HindIII/KpnI*으로 개봉한 pGA1611으로 double ligation을 실시하였다.

다. *B. subtilis* Protox 유전자 형질전환용 벡터로의 삽입

두 종류의 Protox 유전자를 pGA1611 벡터로 도입하였다(Fig. 3-8). Transit sequence를 *B. subtilis* Protox 유전자와 붙인 후 pGA1611 벡터에 삽입한 것과, *B. subtilis* Protox 유전자를 pGA1611 벡터에 삽입한 2가지 구조를 본 실험에 사용하였다. pGA1611 벡터는 벼 형질전환용으로 개발된 것으로 벼에 왕성히 발현될 수 있도록 ubiquitin promoter가 부착되어 있는 것이 특징이다. 두 종류의 벡터를 조합한 후 *A. tumefaciens* LBA4404를 host strain으로 이입시킨 후 *Agrobacterium*에 이들 plasmid가 들어 있는지 조사한 결과, Fig. 3-9에 나타난 바와 같이 Protox 유전자(P) 및 transit sequence + protox (T+P) 유전자가 있음을 plasmid mini prep 및 PCR로 확인할 수 있게 되었으며 이들 *Agrobacterium*을 형질전환에 사용하였다.

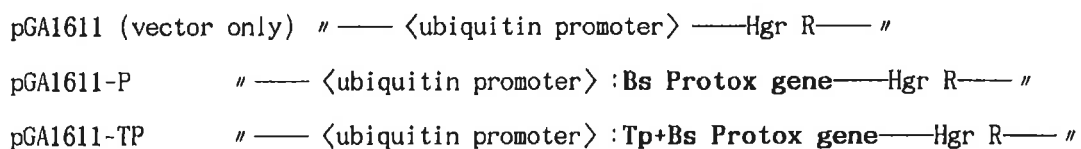


Fig. 3-8. 형질전환을 위한 조작된 두 가지 재조합 pGA1611 벡터.

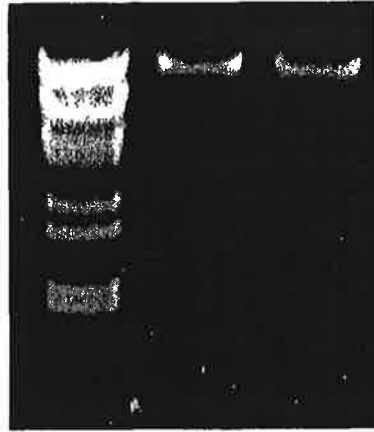


Fig. 3-9. *Agrobacterium* LBA4404에 도입된 Protox 유전자의 재확인 (molecular marker, T, T+P 유전자 순)

라. 벼의 형질전환

1) 벼의 배반에서 유래한 캘러스 배양

벼의 종자가 깨지지 않도록 유의하면서 종피를 제거한 후 종자를 다음과 같이 살균하였다. 70% 에탄올의 10mL에 약 30초 동안 살균한 다음 약 50분 동안 2% NaOCl의 10mL로 부드럽게 흔들며 주면서 표면 살균하였다. 약 30분 동안 멸균된 증류수 30mL로 3-4회에 걸쳐 완전히 씻어낸 다음 sterile filter paper 표면으로 종자를 옮겨서 물기를 말린 후 종자를 2N6 기본 배지에 치상하였다.

2) 캘러스의 활성화

2N6 기본 배지에서 4주 이상 암 배양한 캘러스 중에서 배반으로부터 유도된 지름이 1-2mm 정도인 compact한 캘러스만을 선별하여 2N6 기본배지에서 3-4일 동안 암 배양하여 활성화시킨다(Fig. 3-10).

3) *Agrobacterium* 매개에 의한 형질전환

적당한 항생제가 함유된 5mL의 YEP 배지에서 *Agrobacterium*을 28°C에서 하루 동안 배양하였다. Cell title은 600nm에서 OD값이 2.0 정도의 탁도가 되도록 준비하였다.

배양 세포가 준비되면 3000rpm으로 10분 동안 원심분리시켜 얻은 침전물을 5mL의 AA-AS 배양액으로 녹인 후 멸균된 Petri dish에 *Agrobacterium*이 녹아 있는 5mL의 AA-AS 배지를 준비하고, 3-4일 배양시킨 캘러스를 배지와 약 30분간 공조 배양하였다. 공조 배양이 끝나면 캘러스에 남아 있는 과잉의 *Agrobacterium*을 없애기 위해

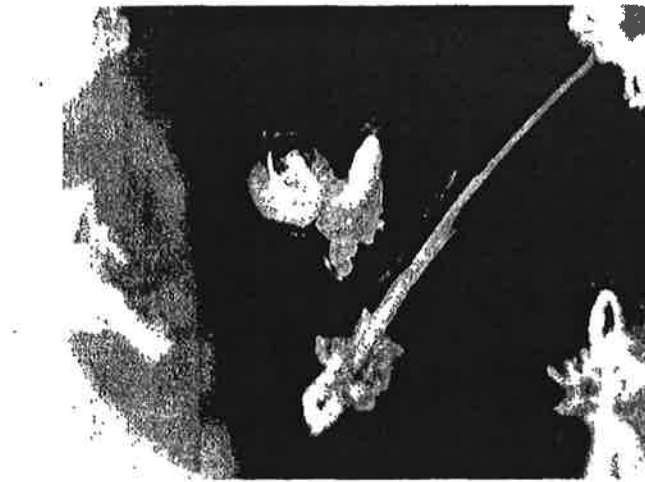


Fig. 3-10. 벼의 배반으로부터 유도된 캘러스.

sterile filter paper 위에 캘러스를 옮겨서 물기를 뺀 후 1mL의 AA-AS 배지가 함유된 sterile filter paper가 깔려있는 2N6-AS 배지로 옮겨서 압 상태의 28℃에서 2-3일 동안 배양하였다. 배양 후 30mL의 cefotaxime 용액(250mg/L)에 담겨 있는 conical flask에 옮겨 캘러스에 붙어 있는 *Agrobacterium*을 제거하기 위하여 약 200rpm으로 3-4회 정도 shaking한 다음 sterile filter paper로 캘러스를 옮겨 물기를 제거하여 건조시킨 후 cefotaxim 및 hygromycin이 함유된 2N6-CH 배지로 옮겼다. 2주마다 새 배지로 옮기면서 한 달에 걸쳐 hygromycin에 저항성을 나타낸 캘러스를 선발하였다 (Fig. 3-11). 선발 과정에서 살아 남은 캘러스 중 살아나는 부분만을 떼어내어 2N6-BN 배지로 옮겨 분화를 유도하였는데 약 한 달 후에는 엽록소가 생성되며 신초의 발생이 이루어졌다(Fig. 3-12). 신초 발생이 일어난 개체만을 떼어내어 식물생장조절제가 함유되지 않은 뿌리 유도용 2N6 배지로 옮겨 뿌리를 유도시켰다.

4) 재 분화된 형질전환 벼의 재배

세포질 또는 색소체에 *B. subtilis* Protox를 발현시킨 형질전환 벼가 온실에 자라고 있는 모습을 Fig. 3-13에 나타내었다.

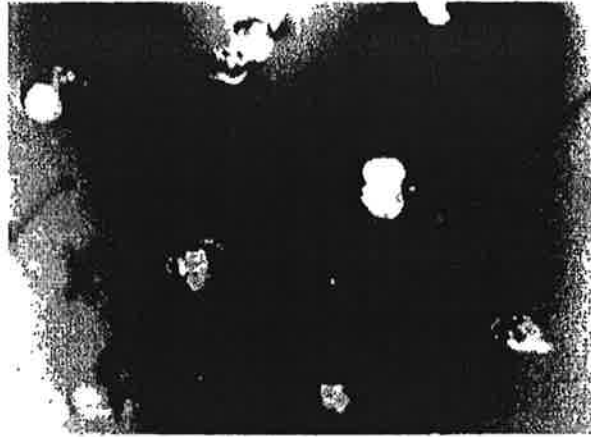


Fig. 3-11. Hygromycin이 함유된 배지로부터 자라는 calli

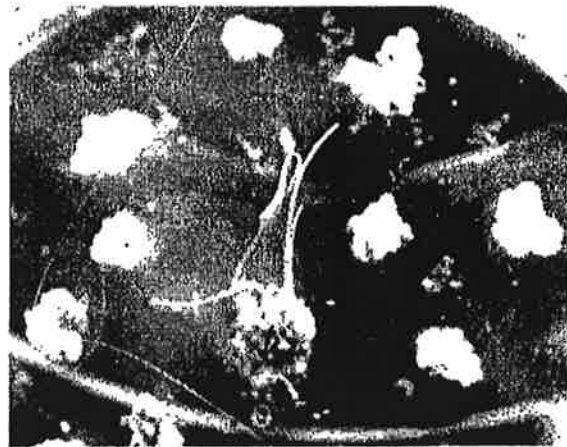


Fig. 3-12. 재 분화배지에서 잎의 분화



Fig. 3-13. 온실에서 자라고 있는 형질전환 낙동벼

마. 벼의 형질전환 여부 확인

1) Southern blot analysis

Hygromycin 선택 배지에서 재 분화된 형질전환 벼가 가지고 있는 계놈으로의 *B. subtilis* Protox 유전자의 안정적인 융합여부를 알아보기 위해 세포질을 목표부위로 한 것 (pGA1611:C) 중 5개체, 색소체를 목표 부위로 한 것 (pGA1611:P) 중 6개체, 그리고 형질을 전환하지 않은 낙동벼의 염 절편으로부터 genomic DNA를 각각 phenol/chloroform 방법으로 추출하여 그 중 5 μ g를 시료로 취하여 digestion buffer가 시료에 잘 스며들도록 4°C에서 2시간 정도 배양한 뒤 *Hind*III 제한효소로 절단하되 두 번에 걸쳐서 완전히 절단하였다. 절단된 genomic DNA를 1X TBE 0.8% agarose gel에 분리시켜 DNA가 절단된 것을 확인하고 nylon membrane에 전이시킨 후 UV-crosslinker로 고정하였다. 이렇게 준비한 nylon membrane을 약 3시간 동안 hybridization buffer로 배양하여 이 buffer에 포화되도록 하였다.

Stratagene Co.의 Prime It[®] kit를 이용, *B. subtilis* Protox 유전자를 probe로 사용하여 random primer 방법으로 ³²P-dCTP 라벨링하여 하루 밤 동안 배양한 다음 2X SSC와 0.1X SSC를 차례로 사용하여 membrane을 세척하고 이를 X-ray film에 감광시키거나 phosphoimaging analyzer로 분석하였다.



Fig. 3-13. 온실에서 자라고 있는 형질전환 낙동벼

마. 벼의 형질전환 여부 확인

1) Southern blot analysis

Hygromycin 선택 배지에서 재 분화된 형질전환 벼가 가지고 있는 계놈으로의 *B. subtilis* Prottox 유전자의 안정적인 융합여부를 알아보기 위해 세포질을 목표부위로 한 것 (pGA1611:C) 중 5개체, 색소체를 목표 부위로 한 것 (pGA1611:P) 중 6개체, 그리고 형질을 전환하지 않은 낙동벼의 엽 절편으로부터 genomic DNA를 각각 phenol/chloroform 방법으로 추출하여 그 중 5 μ g를 시료로 취하여 digestion buffer가 시료에 잘 스며들도록 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 정도 배양한 뒤 *Hind*III 제한효소로 절단하되 두 번에 걸쳐서 완전히 절단하였다. 절단된 genomic DNA를 1X TBE 0.8% agarose gel에 분리시켜 DNA가 절단된 것을 확인하고 nylon membrane에 전이시킨 후 UV-crosslinker로 고정하였다. 이렇게 준비한 nylon membrane을 약 3시간 동안 hybridization buffer로 배양하여 이 buffer에 포화되도록 하였다.

Stratagene Co.의 Prime It[®] kit를 이용, *B. subtilis* Prottox 유전자를 probe로 사용하여 random primer 방법으로 ³²P-dCTP 라벨링하여 하루 밤 동안 배양한 다음 2X SSC와 0.1X SSC를 차례로 사용하여 membrane을 세척하고 이를 X-ray film에 감광시키거나 phosphoimaging analyzer로 분석하였다.

이와 같이 1.4kb의 *B. subtilis* Protox 유전자를 probe로 사용하여 genomic Southern blot hybridization을 수행한 결과, 세포질을 목표 부위로 했던 T₀ 세대의 C2, C5 그리고 C6 line들은 크기에서 5kb 이상의 여러 밴드를 보여주고 있으며 벼 게놈의 서로 다른 위치에 다중 삽입되었음을 알 수 있었다. 이와는 대조적으로 C1과 C3 line들은 하나의 밴드만을 나타내고 있었다. 색소체를 목표 부위로 했던 line에서는 3개의 밴드를 나타내는 P15 line를 제외하고는 6개 중 5개의 line에서 단독 삽입되었음을 알 수 있었다(Fig. 3-14).

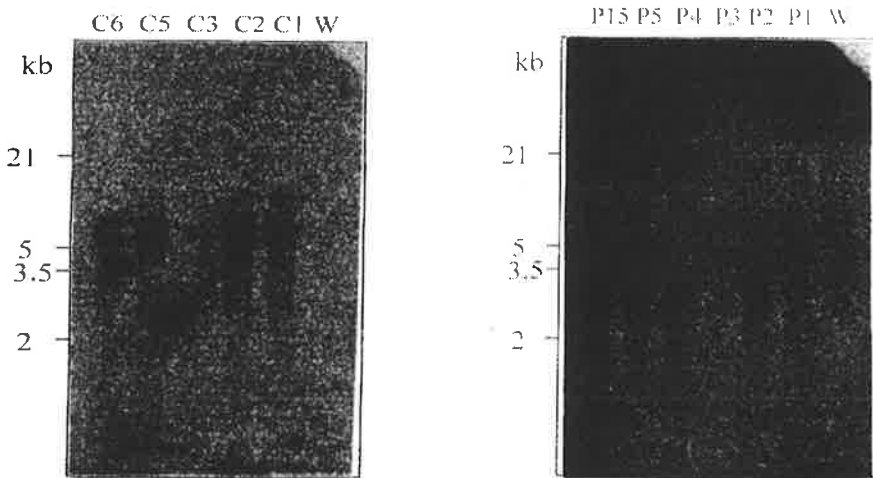


Fig. 3-14. Southern blot of *Hind*III digests of genomic DNA from nontransgenic rice 'Nakdong' (W), cytosol transgenic lines (C1, C2, C3, C5, and C6) and plastid transgenic lines (P1, P2, P3, P4, P5, and P15) at T₀ generation probed with the 1.4 kb PCR fragment containing *B. subtilis* Protox gene.

한편, T₁ 세대에서의 Southern분석에서는 재배종 낙동벼(W), *B. subtilis* Protox 유전자가 실리지 않은 벡터만 삽입된 transgenic control(TC) 계통, C3, C4, P4, 그리고 P15의 6개 계통의 게놈 DNA를 분석하였는데 W와 TC를 제외한 4계통에서 T₀세대에서의 분석 때와 동일한 약 5kb 위치에 밴드가 감지되었고 그 밴드수도 T₀세대에서의 분석 때와 일치하는 양상을 나타내어 *B. subtilis* Protox 유전자가 다음세대의 게놈에 안정적으로 전이되고 있음을 알 수 있었다(Fig. 3-15).

이와 같이 1.4kb의 *B. subtilis* Protox 유전자를 probe로 사용하여 genomic Southern blot hybridization을 수행한 결과, 세포질을 목표 부위로 했던 T₀ 세대의 C2, C5 그리고 C6 line들은 크기에서 5kb 이상의 여러 밴드를 보여주고 있으며 벼 게놈의 서로 다른 위치에 다중 삽입되었음을 알 수 있었다. 이와는 대조적으로 C1과 C3 line들은 하나의 밴드만을 나타내고 있었다. 색소체를 목표 부위로 했던 line에서는 3개의 밴드를 나타내는 P15 line를 제외하고는 6개 중 5개의 line에서 단독 삽입되었음을 알 수 있었다(Fig. 3-14).

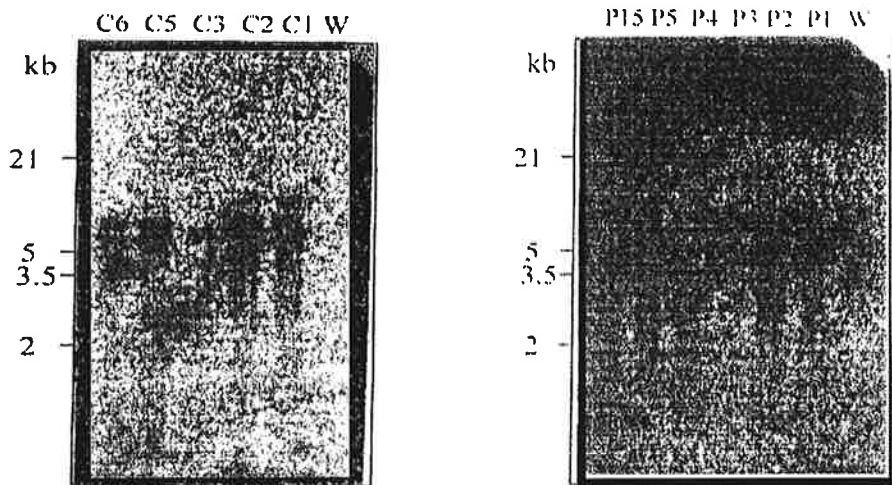


Fig. 3-14. Southern blot of *Hind*III digests of genomic DNA from nontransgenic rice 'Nakdong' (W), cytosol transgenic lines (C1, C2, C3, C5, and C6) and plastid transgenic lines (P1, P2, P3, P4, P5, and P15) at T₀ generation probed with the 1.4 kb PCR fragment containing *B. subtilis* Protox gene.

한편, T₁ 세대에서의 Southern분석에서는 재배종 낙동벼(W), *B. subtilis* Protox 유전자가 실리지 않은 벡터만 삽입된 transgenic control(TC) 계통, C3, C4, P4, 그리고 P15의 6개 계통의 게놈 DNA를 분석하였는데 W와 TC를 제외한 4계통에서 T₀세대에서의 분석 때와 동일한 약 5kb 위치에 밴드가 감지되었고 그 밴드수도 T₀세대에서의 분석 때와 일치하는 양상을 나타내어 *B. subtilis* Protox 유전자가 다음세대의 게놈에 안정적으로 전이되고 있음을 알 수 있었다(Fig. 3-15).

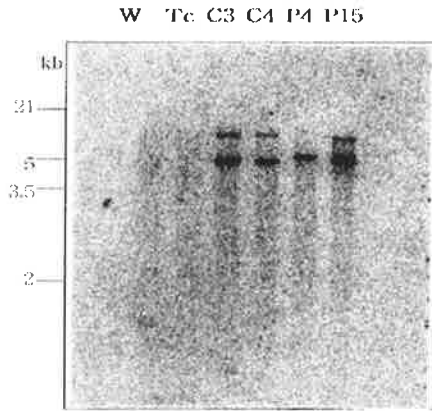


Fig. 3-15. Southern blot of *Hind*III digests of genomic DNA from nontransgenic rice 'Nakdong' (W), transgenic control (Tc), cytosol transgenic lines (C3 and C4) and plastid transgenic lines (P4 and P15) at T₁ generation probed with the 1.4 kb PCR fragment containing *B. subtilis* Protox gene.

벼 게놈내의 다른 위치에 다른 copy수로 삽입된 계통들을 확보하기 위해 색소체의 외막에 형질을 도입시켰던 경우의 계통들을 추가로 분석하였다(Fig. 3-16). T₁ 세대 Southern 분석에서 P4와 P15 계통이 각각 1 copy와 3 copy로 삽입되었음이 확인되었는데 이번 분석에서는 P3 계통이 벼의 게놈 내의 약 6kb와 8kb위치에 2 copy로 삽입된 것으로 나타났다. P8 계통은 P15 계통과 비슷하였으며 P2와 P9를 제외한 계통들도 1 copy로 삽입되어 있는 것으로 나타났다.

T₁세대에서의 Southern분석에서 W와 TC에서는 밴드가 감지되지 않았으며, 나머지 4계통에서 T₀세대에서의 분석 때와 동일한 약 5kb 위치에 밴드가 감지되었고, 그 밴드 수도 T₀세대에서의 분석 때와 일치하는 양상을 나타내어 *B. subtilis* Protox 유전자가 다음세대의 게놈에 안정적으로 전이되고 있음을 보고한 바 있다. 또한 T₂세대에서의 양상에서도 C3, C4와 P4등은 T₀, T₁세대에서의 분석결과와 동일하게 하나의 유전자가 삽입되었음을 나타내고 있다. 그러나 T₁세대까지는 3copy를 나타내었던 P15의 경우, T₂세대 분석결과 하나의 유전자만이 감지되어서 기존의 결과와 상이하게 나타났다(Fig. 3-17). T₂세대로 전이되는 과정에서 유전자가 유실되었을 것으로 사료된다.

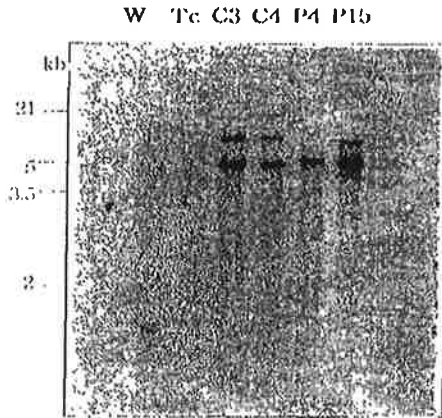


Fig. 3-15. Southern blot of *Hind*III digests of genomic DNA from nontransgenic rice 'Nakdong' (W), transgenic control (Tc), cytosol transgenic lines (C3 and C4) and plastid transgenic lines (P4 and P15) at T₁ generation probed with the 1.4 kb PCR fragment containing *B. subtilis* Protox gene.

벼 계놈내의 다른 위치에 다른 copy수로 삽입된 계통들을 확보하기 위해 색소체의 외막에 형질을 도입시켰던 경우의 계통들을 추가로 분석하였다(Fig. 3-16). T₁ 세대 Southern 분석에서 P4와 P15 계통이 각각 1 copy와 3 copy로 삽입되었음이 확인되었는데 이번 분석에서는 P3 계통이 벼의 계놈 내의 약 6kb와 8kb위치에 2 copy로 삽입된 것으로 나타났다. P8 계통은 P15 계통과 비슷하였으며 P2와 P9를 제외한 계통들도 1 copy로 삽입되어 있는 것으로 나타났다.

T₁세대에서의 Southern분석에서 W와 TC에서는 밴드가 감지되지 않았으며, 나머지 4계통에서 T₀세대에서의 분석 때와 동일한 약 5kb 위치에 밴드가 감지되었고, 그 밴드 수도 T₀세대에서의 분석 때와 일치하는 양상을 나타내어 *B. subtilis* Protox 유전자가 다음세대의 계놈에 안정적으로 전이되고 있음을 보고한 바 있다. 또한 T₂세대에서의 양상에서도 C3, C4와 P4등은 T₀, T₁세대에서의 분석결과와 동일하게 하나의 유전자가 삽입되었음을 나타내고 있다. 그러나 T₁세대까지는 3copy를 나타내었던 P15의 경우, T₂세대 분석결과 하나의 유전자만이 감지되어서 기존의 결과와 상이하게 나타났다(Fig. 3-17). T₂세대로 전이되는 과정에서 유전자가 유실되었을 것으로 사료된다.

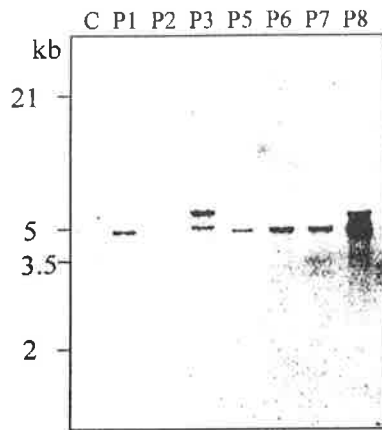


Fig. 3-16. Southern blot of *Hind*III digests of genomic DNA in other T₁ transgenic lines targeted to plastid envelope membrane.

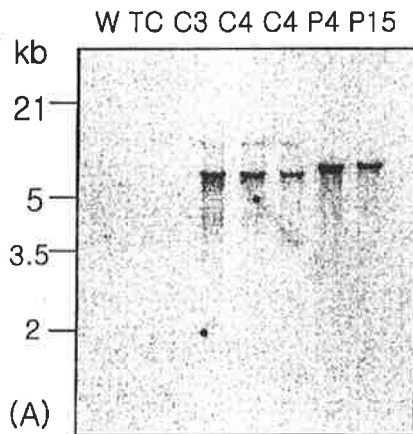


Fig. 3-17. Southern blot of *Hind*III digests of genomic DNA in other T₂ transgenic lines targeted to plastid envelope membrane.

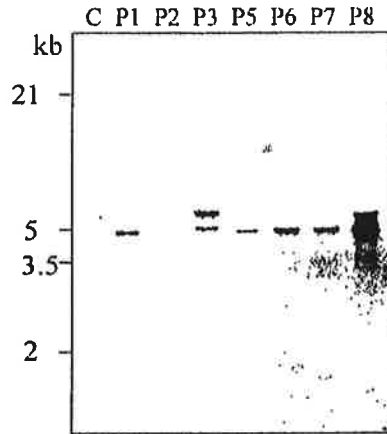


Fig. 3-16. Southern blot of *Hind*III digests of genomic DNA in other T₁ transgenic lines targeted to plastid envelope membrane.

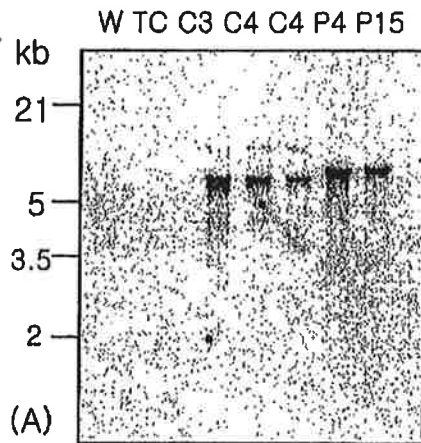


Fig. 3-17. Southern blot of *Hind*III digests of genomic DNA in other T₂ transgenic lines targeted to plastid envelope membrane.

2) Northern blot analysis

B. subtilis Prottox 유전자를 전이시켜 형질을 전환한 벼에서의 전사율을 알아보기 위해 Sigma Co.의 TRI[®] reagent를 1mL/0.1g 사용하여 상기와 같은 line들의 엽 절편으로부터 total RNA를 추출한 뒤 15 μ g 정도의 시료를 취하여 에탄올로 침전시켰다. 이 RNA를 0.8% formaldehyde agarose gel에 분리시켜 25mM sodium phosphate로 두 번에 걸쳐 세척한 후 nylon membrane에 전이시킨 다음 상기의 Southern blot 분석과 동일한 방법, 동일한 probe로 insert를 라벨화하여 Northern blot 분석을 수행하였다. 세포질과 색소체를 대상부위로 하여 형질의 전환을 시도하였던 T₀ 세대의 개체로부터 잎을 채취하여 전체 RNA를 분석한 결과 *B. subtilis* Prottox mRNA가 감지되었으며, 반면 형질전환하지 않은 잎으로부터 추출한 전체 RNA에서는 Prottox mRNA가 존재하지 않았다. 목표 부위가 세포질인 경우 C1과 C3 line에서는 매우 낮은 발현율을 보였으며 C2, C5 그리고 C6 line에서는 상대적으로 높은 *B. subtilis* Prottox mRNA의 발현을 볼 수 있었다. 색소체를 목표부위로 했던 line에서는 모든 line에서 mRNA의 발현을 시킬 수 있는 것으로 나타났으며 P15 line에서는 그 정도가 가장 높은 것으로 나타났다 (Fig. 3-18).

T₁ 세대의 W, TC, C3, C4, P4 및 P15의 6개 계통의 전체 RNA를 분석한 결과, T₀ 세대에서 mRNA의 전사가 감지되었던 4계통에서 모두 *B. subtilis* Prottox mRNA의 발현을 나타내어 *B. subtilis* Prottox mRNA로의 전사가 세대가 지나도 정상적으로 이루어지고 있음을 알 수 있었다. 계놈 DNA에 3 copy로 삽입되었던 P15 계통에서 그 발현 정도가 가장 높은 것을 알 수 있었다 (Fig. 3-19).

T₁세대 6개 계통의 전체 RNA를 분석한 결과 T₀세대에서 mRNA의 전사가 감지되었던 4계통에서 모두 *B. subtilis* Prottox mRNA의 발현을 나타내어 *B. subtilis* Prottox mRNA로의 전사가 세대가 지나도 정상적으로 이루어지고 있음을 알 수 있었다. 계놈 DNA에 3 copy로 삽입되었던 P15에서 그 발현정도가 가장 높은 것을 알 수 있었다. 그러나 T₂세대에서의 전사율의 정도를 알아보기 위한 Northern blot 분석에서는 T₁세대 까지 전사율이 가장 높았던 P15에서 전사율이 감소하였으며, P15보다 높지 않았던 P4가 *B. subtilis* Prottox mRNA로의 전사가 가장 높게 나타났다(Fig. 3-20). T₁세대까지 유전자가 3 copy로 삽입되었던 P15의 copy수가 T₂세대에서 하나의 유전자로 바뀌어 그에 따라 전사율도 변했으리라 생각된다.

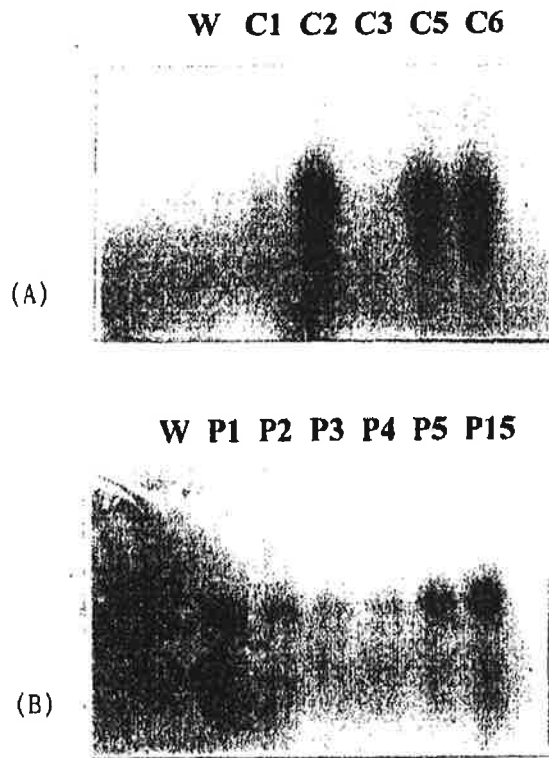


Fig. 3-18. Northern blot of total cellular RNA from nontransgenic rice 'Nakdong' (W), cytosol targeting lines (C1, C2, C3, C5, and C6) and plastid targeting lines (P1, P2, P3, P4, P5, and P15) at T_0 generation probed with the 1.4 kb PCR fragment. (A) Three exposures of the C2, C5, and C6 lanes are shown. (B) All lanes of the blot are shown except nontransgenic rice 'Nakdong' (W).

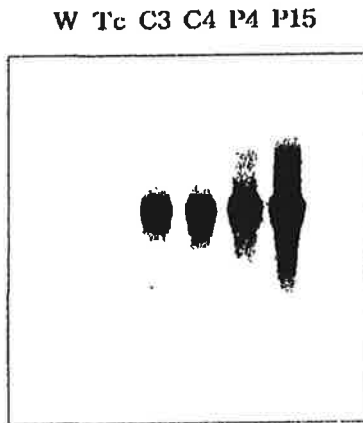


Fig. 3-19. Northern blot of total cellular RNA from nontransgenic rice 'Nakdong' (W), transgenic control (Tc), cytosol targeting lines (C3 and C4) and plastid targeting lines (P4 and P15) at T₁ generation probed with the 1.4 kb PCR fragment.

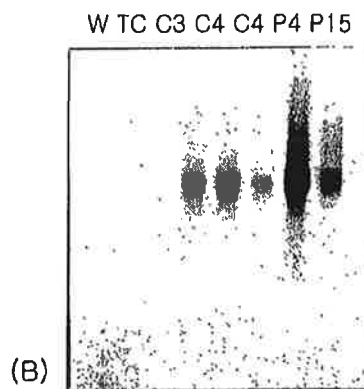


Fig. 3-20. Northern blot of total cellular RNA from nontransgenic rice 'Nakdong' (W), transgenic control (TC), cytosol targeting lines (C3 and C4) and plastid targeting lines (P4 and P15) at T₂ generation probed with the 1.4 kb PCR fragment.

3) Western blot analysis

B. subtilis Prottox 폴리펩티드의 생성 유무를 알아보기 위해 *B. subtilis* Prottox에 대항하여 만들어진 항체를 사용한 T₁ 세대의 세포질 단백질을 *B. subtilis* Prottox 항체와 면역반응을 시킨 경우, 재배종 낙동벼를 포함한 모든 계통에서 *B. subtilis* Prottox 단백질과 같은 크기의 단백질이 감지되었다(Fig. 3-21A).

재배종 낙동벼에서의 단백질의 감지는 정확한 이유는 알 수 없으나 재배종 낙동벼와 *B. subtilis* Prottox간에 공유하는 아미노산이 존재하든지 아니면 비 특이적으로 결합한 결과라고 생각된다. 다른 생화학적 분석에서의 양상과 마찬가지로 색소체에서 발현된 경우 세포질에서의 경우보다 3-4배 더 높은 강도의 밴드를 보였다.

반면 막 단백질을 반응시킨 경우 형질이 전환된 계통 즉, C3, C4, P4, P15 계통들에서 *B. subtilis* Prottox 단백질과 같은 크기의 위치에서 모두 비슷한 강도의 반응을 보였다. 그러나 *B. subtilis* Prottox가 삽입되지 않은 계통 즉, W, TC 계통에서는 항체반응이 나타나지 않아 외래유전자를 도입시킨 계통에서만 단백질 생성시킬 수 있다는 것을 알 수 있었다(Fig. 3-21B). 형질전환이 되지 않은 계통에서 특이적인 반응을 보이지 않음에도, 형질전환계통에서만 2개의 다른 밴드가 감지가 되고 세포질

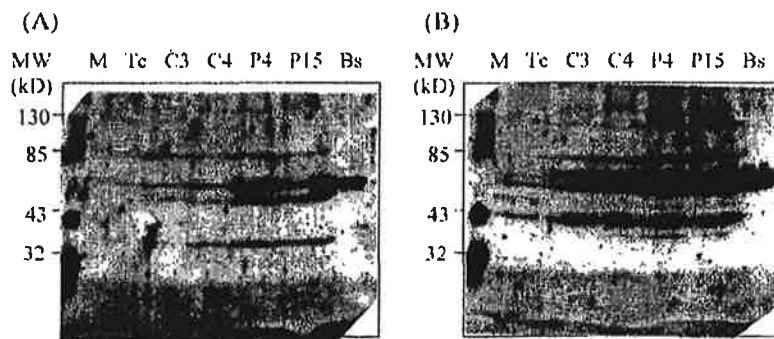


Fig. 3-21. (A) When the soluble proteins were immunoreacted with the *B. subtilis* Prottox antibody, proteins that were equivalent in size to the *B. subtilis* Prottox were shown to be cross-reacted at all the lines including control. (B) As for the microsomal proteins, the antibody reactive proteins with all equal intensity were observed only in the transformed plants, but no corresponding proteins were detected in the untransformed control.

에서 보다 섹소체에서의 더 높은 발현 그리고 *B. subtilis* Prottox의 proprotein의 존재 등으로 볼 때 간접적이지만 형질이 전환된 계통에서 *B. subtilis* Prottox 유전자가 발현된다는 것을 뒷받침한다고 볼 수 있을 것이다.

바. T₁ 세대에서의 hygromycin 저항성 개체의 분리비율 분석

재 분화된 형질전환 식물체 중 4개 line과 pGA1611 벡터만 내재하는 transgenic control을 선정하여 자가수분된 T₁ 세대에서의 형질전환 유전자의 유전 여부를 알아보기 위해 이 종자들의 발아 분리 비율을 살펴보았다. 종피를 벗겨낸 종자를 70% 에탄올과 2% NaOCl로 표면 살균한 뒤 멸균수를 사용하여 잘 씻어내고 여과지로 옮겨 종자의 표면에 있는 물기를 제거한 다음 50 µg/mL hygromycin을 첨가한 1/2MS 고체 배지에 각각 치상하여(Fig. 3-22) 28°C의 암조건에서 약 10일에 걸쳐 발아 유무를 관찰·조사한 결과, hygromycin의 영향을 내재한 분리비율이 나타났다(Figs. 3-23, 24). Hygromycin 감수성과 저항성의 양상이 비슷한 비율로 나타난 C3 line을 제외한 나머지 line에서는 3:1의 분리비율에 가까운 양상을 보였다(Table 3-1). 특히 C3 line에서는 멘델의 분리 비율과 일치하지 않았으며 고농도에서는 오히려 감수성을 보였다.

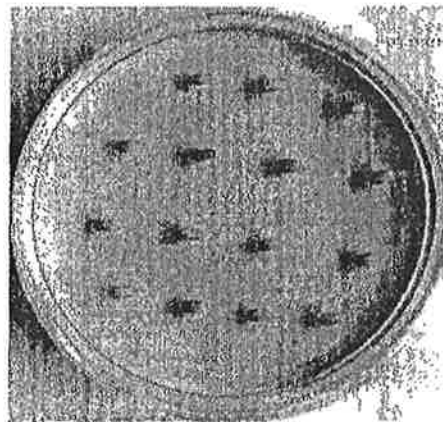


Fig. 3-22. T₁ seeds placed on MS solidified medium supplemented with 50 µg/mL hygromycin.

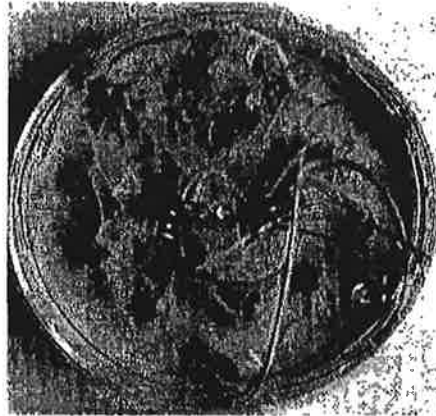


Fig. 3-23. Germination and growth of T₁ generation on MS solidified medium containing 50 μ g/mL hygromycin.

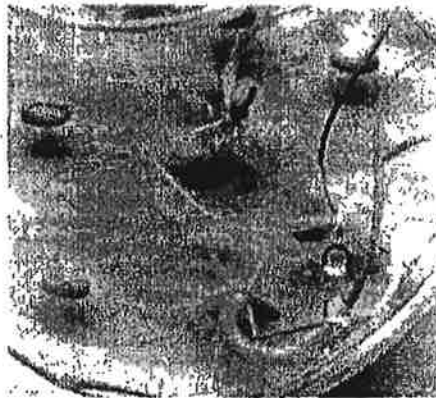


Fig. 3-24. Transgenic rice seeds exhibited active growth (right). The nontransgenic rice seeds were germinated at early stage but stopped their growth following their germination (left).

Table 3-1. Segregation of the hygromycin resistant trait at T₁ generation.

Transgenic line	Resistant	Sensitive	Ratio	χ^2 value(3:1)
TC	18	7	3:1	0.12
C3	19	16		
C4	22	13	3:1	2.75
P4	13	7	3:1	1.07
P15	16	4	3:1	0.27

1) 다수의 색소체 발현 형질전환 벼 추가육성 및 T₁종자 획득

B. subtilis Prottox 유전자를 벼의 게놈에 도입하여 *B. subtilis* Prottox를 세포질과 색소체에 발현시킨 결과, 세포질에서보다는 색소체에서 발현된 line들이 oxyfluorfen에 대한 저항성 정도가 높음을 보여주었다. 즉 제초제 저항성 정도가 보다 더 높은 벼를 개발하기 위해서는 색소체 부위에 *B. subtilis* Prottox를 발현시키되 그 유전자의 삽입 위치가 상이한 다양한 형질전환체를 추가로 확보해야 했다. 따라서, 색소체를 발현 부위로 한 25개의 형질전환체를 기존의 형질전환과 동일한 방법으로 개발하였으며, 이들로부터 T₁종자를 확보하였다. T₀ 형질전환체를 겨울 온실 조건에서 육성하여 불임률이 높아 종자량이 매우 적었으며, 각 line별 종자의 채종량은 다음과 같다(Table 3-2).

2) 색소체 발현 T₁세대 종자의 hygromycin 저항성 유무 및 분리비 분석

색소체 형질전환체의 T₁종자를 hygromycin 50mg/L이 함유된 1/2MS 배지에 치상하여 hygromycin에 대한 저항성 여부를 검정하였다. P1을 포함하여 P3, P5, P44, P55에서 저항성과 감수성의 비율이 3:1로 분리됨을 보였다. Southern blot 분석에서 삽입된 유전자가 두개의 copy로 확인된 P6의 경우 분리비가 1:3(저항성:감수성)으로 나타나 저항성 표현형이 열성으로 나타나는 비정상적인 유전 분리비를 보였다. 종자의 확보

Table 3-2. 색소체 발현 형질전환체 추가선발 및 T₁종자 확보량

Transgenic line	Number of seeds	Transgenic line	Number of seeds
P1	16	P26	15
P3	88	P28	53
P5	19	P30	8
P6	91	P36	6
P7	29	P38	15
P9	7	P41	11
P12	74	P42	31
P14	1	P44	56
P17	25	P49	24
P20	92	P55	11
P21	22	P57	10
P25	60	P58	53

가 적어서 신뢰성이 높은 유전 분석은 불가능하였으며 보다 많은 종자로 분리비 분석을 수행하여야 할 것으로 생각된다. 그러나 3 copy로 존재하는 것으로 나타난 P44의 경우 유전자가 3 copy가 존재함에도 불구하고 1쌍의 우성유전자 형질발현처럼 분리하는 것으로 보아 같은 하나의 부위에 여러 개의 유전자가 삽입되어 형질을 발현하는 것으로 생각된다 (Table 3-3).

사. Oxyfluorfen 저항성 검정

여러 농도의 oxyfluorfen이 함유된 각각의 배지에 형질전환 개체와 비형질전환 개체의 종자를 치상한 후 10일 후에 그들의 반응 양상을 살펴보았다. 치상 후 4일까지 암상태에서 배양하여 발아를 유도한 다음 광상태에 노출시켰다. A, B, C, 그리고 D의 4부분은 각각 3, 1, 0.1 μ M, 그리고 무처리의 환경에서 생육한 모습이다(Fig. 3-25). 각 부분의 왼쪽 개체는 비형질전환체이고 오른쪽 개체는 세포질에 형질전환시킨 개체들의 모습이다. 두 계통간의 제초제 저항성의 양상은 형질전환 개체가 비형질전환 개체보다 경미한 차이로 저항성이 있음을 달관으로 알 수 있었다. 3 μ M의 농도에서 형질전환 개체와 비형질전환 개체 모두 제초제에 의해 생육저해를 받았으며, 1 μ M과 0.1 μ M의 농도에서는 형질전환 개체가 비형질전환 개체보다 더 양호한 생육을 보여

제초제에 대한 저항성이 있음을 알 수 있었다. 색소체의 외막에 형질을 도입하였던 개체들 또한 이와 비슷한 양상을 보였다.

Table 3-3. 색소체 발현 T₁세대 종자의 hygromycin 저항성 분리비율 검정

Transgenic line	Resistant	Sensitive	χ^2 value(3:1)
P1	8	3	0.03
P3	9	3	0.0
P5	5	3	0.66
P6	4	9	13.56
P7	5	5	3.33
P9	3	2	0.6
P12	3	4	3.85
P14	2	9	18.93
P17	1	3	5.33
P20	1	8	19.59
P21	3	4	3.85
P25	6	5	2.45
P26	3	5	6.0
P28	5	5	3.33
P30	4	0	1.33
P36	1	5	10.88
P38	6	6	4.0
P41	4	4	2.66
P42	6	6	4.0
P44	7	3	0.13
P49	0	8	24.0
P55	6	1	0.42
P57	4	4	2.66
P58	0	11	33.0

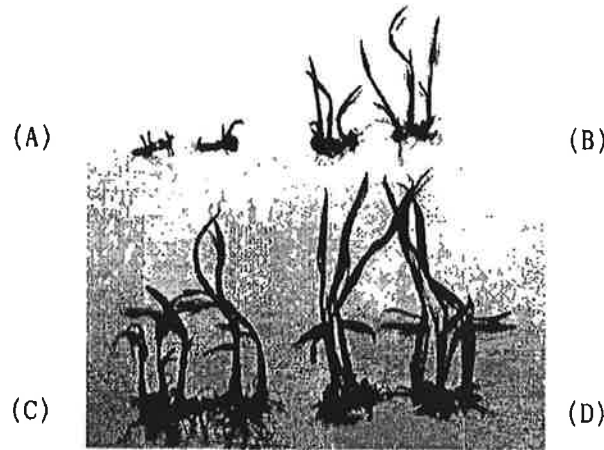


Fig. 3-25. Response of transgenic and nontransgenic rice plants to various oxyfluorfen concentrations. (A) $3\mu\text{M}$, (B) $1\mu\text{M}$, (C) $0.1\mu\text{M}$, and (D) control.

아. 색소체 발현 T_2 형질전환체의 copy수에 따른 제초제 저항성 검정

T_2 세대의 색소체 발현 형질전환체 중 벼의 게놈 내에 서로 다른 copy수로 삽입된 line을 선정하여 leaf disk assay를 통하여 oxyfluorfen 저항성 여부를 육안으로 검정하여 본 결과, 비형질전환체인 wild type은 $1\mu\text{M}$ 에서부터 엽록소 합성의 저해를 받았으며, $3\mu\text{M}$ 이상에서는 회복하지 못할 정도로 심각한 탈색을 나타내 제초제에 의해 피해를 입었음을 알 수 있었다. 또한, TC에서도 wild type과 동일한 경향을 나타내어 본 실험에 사용하였던 vector 자체로는 제초제에 대한 저항성을 갖지 않는 것으로 판명되었다. 반면에 *B. subtilis* Prottox 유전자를 도입하였던 line들은 $10\mu\text{M}$ 에서도 탈색이 거의 일어나지 않는 것으로 보여 외부로부터 도입하였던 유전자가 작동하고 있으며, *B. subtilis* Prottox가 식물체내에서 다량 생성되어 oxyfluorfen에 어느 정도 저항할 수 있는 역할을 하는 것으로 생각된다. 특히 P2106, P2032(P4), 그리고 P2053(P15)은 다른 형질전환체들에 비해 높은 저항성을 가진 것으로 보였다. Copy수와 저항성과의 상관관계에서는 3 copy로 삽입된 P2108(P44)이 1 copy로 삽입된 P2106(P38)에 비해 제초제에 더욱 감수성인 것으로 나타났다. 따라서, copy수 증가에 따른 제초제 저항성의 증대효과는 없는 것으로 사료된다(Fig. 3-26).

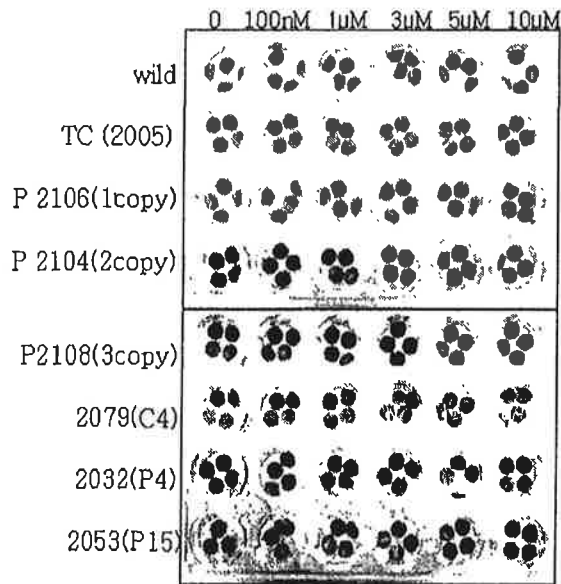


Fig. 3-26. Copy수에 따른 oxyfluorfen 저항성 차이 검정. P2104, P2106, 그리고 P2108은 각각 P6, P38, P44와 동일한 line임. TC는 vector만 삽입된 형질전환변이
고, 그 외 C4, P4, 그리고 P15는 3-4년차에 선발된 제초제 저항성 형질전환변이.

제 4 절 결과요약

3가지 유형의 벡터조합을 이용하여 형질전환을 시도하였으며, ubiquitin promoter 를 사용하여 지속적인 발현을 유도하였다. 균주로는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 이용하였고, hygromycin을 이용하여 형질이 전환된 callus와 재 분화배지에서 형질전환 개체들을 선별하였다. 평균적으로 hygromycin선발배지에서 10-15% calli들이 살아남았으며, 그 중의 1-5%만이 재 분화되어 뿌리를 유도하여 수확할 때까지 생육시켰다. 다음세대에서의 유전자의 존재유무를 알아보기 위한 DNA blot, RNA blot 그리고 Western blot 등의 분석결과, 유전자는 다음세대로 전이가 되고 있었으며 일부 계통에서는 세대가 진전되면서 유전자의 일부를 소실하는 경우도 있었다. Leaf disk assay를 통하여 본 oxyfluorfen 저항성 검정에서 비형질전환체인 wild type은 1 μ M에서부터 엽록소 합성의 저해를 받았으며, 3 μ M이상에서는 회복하지 못할 정도로 심각한 탈색을 나타내 제초제에 의해 피해를 입었음을 알 수 있었다. 또한, TC에서도 wild type과 동일한 경향을 나타내어 본 실험에 사용하였던 vector 자체로는 제초제에 대한 저항성을 갖지 않는 것으로 판명되었다. 반면에 *B. subtilis* Prottox 유전자를 도입하였던 line들은 10 μ M에서도 탈색이 거의 일어나지 않는 것으로 보여 oxyfluorfen에 어느 정도 저항할 수 있는 형질을 가지게 된 것을 확인하였다. 또한 유전자의 삽입개수는 1-3개 정도로 다양하였지만 제초제를 처리해 본 결과, 유전자의 개수가 제초제에 대한 저항성을 증가시키지는 않는다는 것도 판명할 수 있었다. 참고로 T₁종자를 다수 확보할 수 없었던 것은 실제 벼의 생육시기가 아니었기 때문이었을 것이므로 종자를 다수 확보하기 위해서는 callus의 재 분화시기를 조절해야만 실험재료인 충실한 후대종자를 수확할 수 있을 것으로 사료된다.

제 5 절 참고문헌

- An, G.H., R.E. Paul, Amitava mitra & B.H. Sam (1988) Plant Mole. Biol. Manual, A3: 7-8.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl, eds. (1987) 1sted., (New york: Wiley Interscience).
- Becerril JM and Duke SO. (1989) Plant Physiol. 90: 1175-1181.
- Camadro JM, Ibrahim NG, and Levere RD. (1984) J. Biol. Chem. 251: 5678-5682.
- Camadro JM, Martinge M, Scalla R, and Labbe P. (1991) Biochem. J. 277: 17-21.
- Chan, M.T., H.H. Chang, S.L. Ho, W.F. Tong and S.M. Yu(1993) Plant Mole. Biol, 22: 491-506.
- Choi KW, Han O, Lee HJ, Yun YC, Moon YC, Kim M, Kuk YI, Han SU, and Guh JO. (1998) Biosci. Biotechnol. Biochem. 62: 558-560.
- Corrigall, A.V., Siziba, K.B., Manele, M.H., Shephard, E.G., Ziman, M., Cailey, T.A., Krsch, R.E. and Meissner, P.N. (1998) Arch. Biochem. Biophys. 358: 251-256.
- Dailey HA and Karr SW. (1987) Biochemistry. 26: 2697-2701.
- Dailey TA, Meisner P, and Dailey HA. (1994) J. Biol. Chem.. 269: 813-815.
- Duke SO, Lydon J, Becerril JM, Sherman TD, Lehnen LP, and Matsumoto H. (1991) Weed Sci. 39: 465-473.
- Duke SO, Nandihalli UB, Lee HJ, and Duke MV (1994) Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. 559: 191-204.
- Gamborg, O.L (1991) Plant Tissue Culture Manual. A1: 1-24.
- Gould, J., Devery, M., asegawa, O., Ulian, E.C., Peterson, G. and Smith, R.H. (1991) Plant Physiol. 95: 426-434.
- Hiei, Y., Komari, T. and Kubo, T. (1997) Plant Mole. Biol. 35: 205-218.
- Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari and T. Kumashiro (1994) The Plant Journal, 6(2): 271-282.

- Hiscox JD, Israelstam GF. (1979) *Can J. Bot.* 57: 1332-1334.
- Jacobs JM and Jacobs NJ. (1987) *Biochem. J.* 244: 219-224.
- Kenyon WH, Duke SO, and Vaughn KC. (1985) *Pestic. Biochem. Physiol.* 24: 240-250.
- Lermontoba, I., E. Kruse, H.P. Mock and B. Grimm (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 8895-8900.
- Matringe M, Camadro JM, Block MA, Joyard J, Scalla R, Labbe P, and Douce R. (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 4646-4651.
- Matringe M, Camadro JM, Labbe P, and Scalla R. (1989) *Biochem. J.* 260: 231-235.
- O'Brian MR, Kirshbom PM, and Maier RJ. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8390-8393.
- O'onor N, Mornet R, Matringe M, Clair D, Scalla R, Fujimoto TT, and Swithenbank C. (1992) *Bioorg. Med. Chem.* 2: 339-342.
- Potrykus, I. (1990) *Bio/Technology.* 8: 33-38
- Nishimura K, Taketani S, and Inokuchi H. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 8076-8080.
- Raineri, D. M., Bottino, P., Gordon, M. P. and Nester, E. W. (1990) *Bio/Technology.* 8: 33-38.
- Ramseier TM, Kaluza B, Studer D, Gloudemans T, Bisseling T, Jordan PM, Jones PM, Zuber M, and Hennecke H. (1989) *Arch. Microbiol.* 151: 203-212.
- Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Von Heijne, G., J. Steppuhn, R.G. Herrmann (1989) *Eur. J. Biochem.* 180: 535-545.
- Witkowski, D.A. and B.P. Halling (1989) *Plant Physiol.* 90: 1239-1242.

제 4 장 광활성 제초제에 대한 형질전환 식물체의 생리, 생화학적 반응

제 1 절 서 설

Oxyfluorfen을 비롯한 DPE계 제초제와 이와 구조적으로 관련된 여러 제초제들은 광상태하에서 식물체의 급격한 탈수와 탈색을 유기시킴으로써 제초 효과를 나타낸다. 이들 제초제는 porphyrin 합성 과정에서 Protogen IX이 산화되어 Proto IX으로 되는 과정에 관여하는 효소인 Protox의 활성을 저해하는 것으로 알려져 있다. 그러나 이들 제초제에 의해 이 효소의 활성이 저해되면 효소의 기질이 아니라 특이하게도 효소의 반응 산물이 급격히 축적된다. 즉 색소체의 외막에 있는 Protox가 제초제에 의해 저해되면 이 효소의 기질인 Protogen IX이 축적되지 못하고 색소체 바깥으로 이동된다. 그 이후 Protogen IX은 원형질막에 존재하는 제초제 내성의 Protox 유사효소의 활성에 의해 Proto IX으로 산화되는데 이 원형질막의 Protox 유사효소는 peroxidase일 것으로 추측되고 있다(Lee et al., 1993). 원형질막은 환원된 상태의 환경이 아니므로 이와 같은 산화 반응이 왕성하게 이루어지며 Proto IX은 친유성 분자로 원형질막에 계속적으로 축적된다. 이렇게 정상적인 porphyrin 합성 경로에서 이탈되어 원형질막에 축적된 Proto IX은 색소체나 미토콘드리아에서 Mg-Proto IX chelatase나 Fe-Proto IX chelatase에 의해 엽록소 및 heme으로의 합성에는 이용될 수 없게 된다(Fig. 4-1). DPE계 제초제의 작용에 의해 porphyrin 합성 과정의 Protox가 저해되면 식물체 내에 Proto IX이 비정상적으로 과다하게 축적되는 것으로 알려져 있는데 Proto IX은 빛을 흡수하여 분자산소로부터 일중항 산소(singlet oxygen, 1O_2)를 만드는 광활성 물질이다. 일중항 산소는 반응성이 매우 높아 전자가 많은 곳을 공격하게 되는데 세포막의 주요 구성 성분인 불포화 지방산을 공격하여 막지질 과산화작용을 일으킨다. 그 결과 원형질막을 비롯한 여러 세포막들이 파괴되어 세포내 구성물질이 누출되고 궁극적으로는 식물이 죽게 된다(Fig. 4-2).

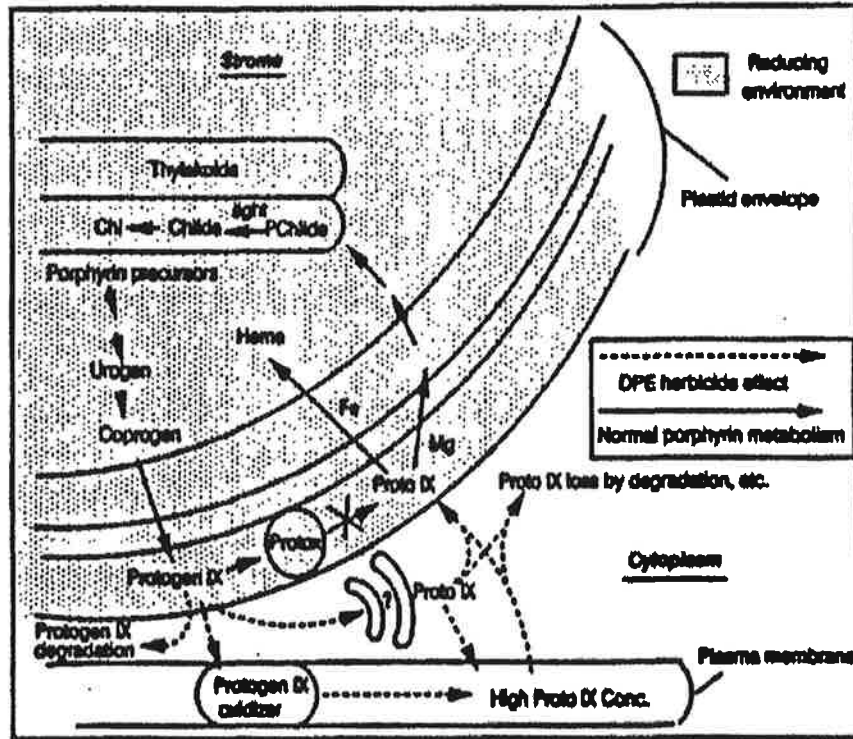


Fig. 4-1. Scheme for mechanism of action of Protox-inhibiting compounds such as DPE herbicides in plant cells.

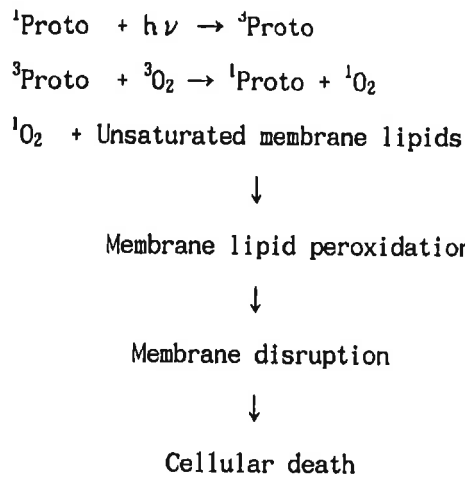


Fig. 4-2. Proto-mediated type II photoperoxidation of membrane lipids.

현재까지 화학종이 다른 수많은 Protox 저해 제초제가 발견되었으나 이들 제초제의 선택성 폭은 매우 좁다. 이들 제초제는 과수나 관상수의 재배지에서 국부처리(direct treatment)용 제초제로 사용되며 이들 제초제에 내성을 보이는 양파, 완두, 대두, 땅콩, 목화 등 몇몇 작물에는 생육기에 사용이 가능하다.

Protox 저해 제초제에 대한 식물의 내성은 다양한 기작에 의해 이루어질 수 있다. 제초제가 잘 흡수되지 않는 잎의 특징을 가지고 있는 양배추, 양파, 소나무 등과 같은 식물은 Protox 저해 제초제에 대해 내성을 나타낸다. 한편 콩과식물의 경우에는 Protox 저해 제초제에 대해 내성을 나타내는데 완두나 땅콩은 fluorodifen을 대사 과정을 통해 분해할 수 있으며 대두는 acifluorfen을 분해할 수 있기 때문이다. 또한 활성산소에 대한 소거능력의 차이 또는 Protox의 저해 이후 색소체 바깥으로 이동한 Protogen IX이 Proto IX으로 산화되지 않고 광활성 물질이 아닌 다른 물질로 변환되는 기작 등이 보고되어 있다(Fig. 4-3). 밀도 DPE계 제초제에 대해 내성을 나타내는 것으로 보고되어 있는데 acifluorfen에 대한 I_{50} 값이 광상태하에서도 10,000 ppb 이상이었으며 acifluorfen과 같은 작용기작을 가지고 있는 UCC-C4234에 대해서도 마찬가지로 내성을 보이는 것으로 알려져 있다(Wright et al., 1995).

Protox 저해 제초제가 수십년 동안 사용되어 왔으나 다른 계통의 여러 제초제들과는 달리 아직까지 이들 제초제에 대한 저항성 식물이 출현하지 않고 있다. 이러한 점은 제초제 사용 후 수년만에 저항성 식물이 나타난 acetyl CoA carboxylase 저해제인 aryloxyphenoxypropionate 및 cyclohexanedione계 제초제나 acetolactate synthase 저해제인 sulfonylurea와 imidazolinone계 제초제 등의 경우와 비교해 볼 때 매우 특이하다. 이는 Protox 저해 제초제의 작용기작이 매우 복잡하고 저약량의 처리로도 살포작용이 수일 이내에 이루어져 저항성 식물이 출현할 만큼 충분한 도태압(selection pressure)이 가해지기가 어렵기 때문인 것으로 풀이된다. 그러나 *B. subtilis*와 같은 박테리아의 Protox는 원형질막의 Protox 유사효소와 마찬가지로 DPE계 제초제에 대해 내성을 나타낸다. 그러므로 박테리아의 Protox 유전자를 작물에 전이시켜 발현케 한다면 제초제 저항성 식물을 만들어 낼 수 있는 가능성이 클 것이다. 현재까지 자연상태에서 Protox 저해 제초제에 대한 저항성이 나타나지 않고 있으므로 이러한 시도가 상업적으로 연계될 가능성이 매우 크다.

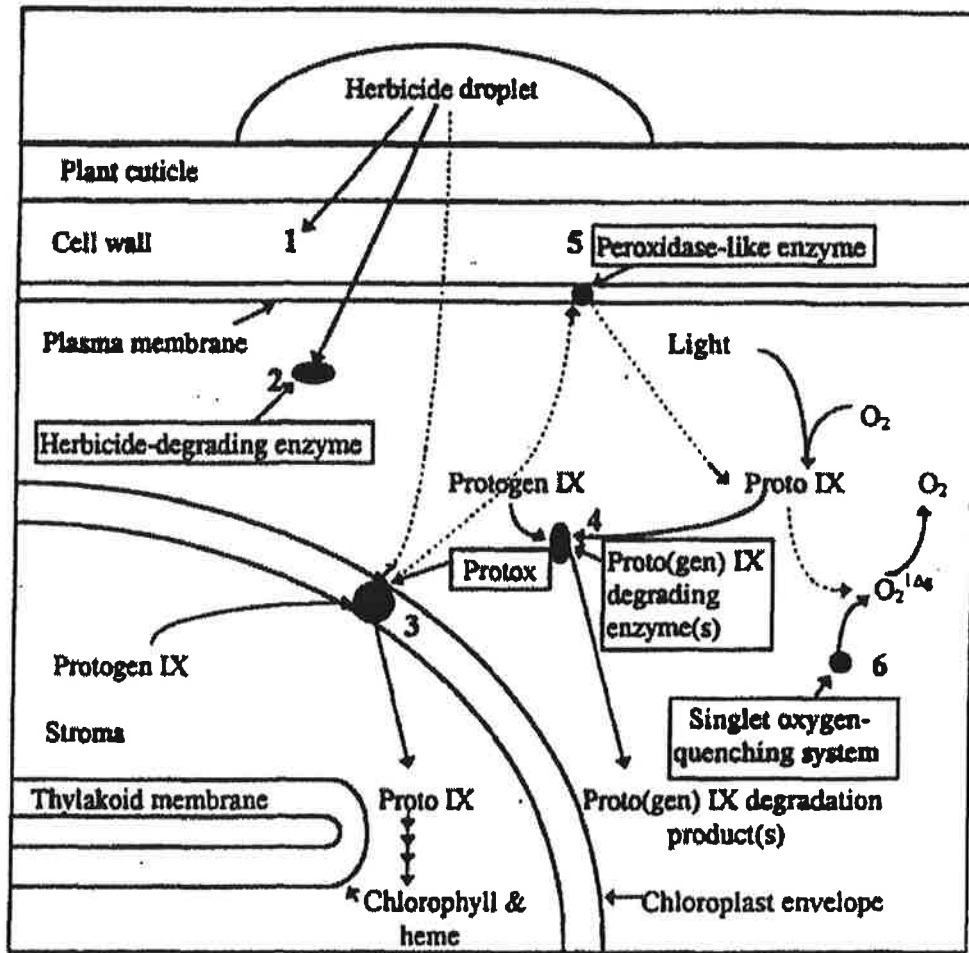


Fig. 4-3. Schematic of possible mechanisms of resistance to Protox inhibitors. The normal herbicide mechanism is denoted by dotted lines. Enzymes are black dots or ovals with names in boxes. Potential sites of resistance are in bold numbers: 1, inhibition of uptake or sequestration of the herbicide; 2, rapid metabolic degradation of the herbicide; 3, herbicide-resistance Protox; 4, degradation of extraplastidic Protox and/or Proto IX; 5, inactivated herbicide-resistant, extraplastidic Protox; 6, quenching of singlet oxygen and other toxic oxygen species.

본 연구에서는 DPE계 제초제인 oxyfluorfen에 대한 식물의 생리·생화학적 연구를 위한 *in vitro* 시스템 확립을 목적으로 재배종 담배를 재료로 하여 oxyfluorfen에 대한 생리학적 반응을 엽기별로 조사하였으며 또한 DPE계 제초제에 대해 내성을 나타내는 것으로 알려진 *B. subtilis* Protox 유전자를 담배에 형질전환시켜 이 형질전환된 담배와 재배종 담배를 대상으로 oxyfluorfen에 대한 생리학적 반응을 비교하였다. 또한 ubiquitin promoter의 영향을 받는 *B. subtilis* Protox 유전자를 낙동벼의 세포질 또는 색소체에서 발현하는 형질전환 벼와 CaMV 35S promoter의 영향을 받는 이유전자를 화성벼의 세포질에 발현되도록 하여 만든 형질전환 벼를 각각의 재배종 벼와 비교하여 oxyfluorfen에 대한 세포내 구성물질의 누출, 엽록소 파괴, 지질과산화작용, Proto IX 및 Protox 활성 등에 대해 조사하였다. 아울러 DPE계 제초제에 대한 밀의 내성 기작을 알아내기 위한 연구로 이들 제초제에 대해 감수성인 것으로 알려진 보리와 비교하여 oxyfluorfen에 대한 생리·생화학적 반응 차이를 온실 및 *in vitro* 상태에서 조사하였다.

제 2 절 연구 수행 방법

DPE계 제초제의 작용에 의해 식물체에서 일어나는 반응의 대표적인 것에는 세포내 전해물질의 누출, 엽록소 파괴, malondialdehyde(MDA)의 생성, Proto IX의 축적 및 Protox의 활성 저해 등이 있는데 *B. subtilis* protoporphyrinogen oxidase(Protox) 유전자를 전이시켜 형질을 전환한 담배와 벼의 oxyfluorfen에 대한 생리·생화학적 반응을 형질을 전환하지 않은 재배종 담배와 벼에서 이루어지는 반응과 비교하였으며 형질전환 벼의 선발과 증식에 대한 실험을 수행하고 있다. 제초제 감수성 식물과 형질전환이 이루어진 제초제 저항성 식물에서의 이러한 반응을 생리, 생화학적인 수준에서 비교, 조사함으로써 저항성 식물에서 일어나는 대사과정과 DPE계 제초제의 작용을 명확히 하고자 하였다. 한편 형질전환에 따른 광합성의 변화가 나타나는지 알아보기 위해 형질을 전환한 벼와 형질을 전환하지 않은 벼의 광합성능과 광합성 효율을 비교하여 조사하였다. 또한 oxyfluorfen에 대해 내성인 것으로 알려진 밀을 대상으로 감수성인 보리와 비교하여 가능한 내성 기작을 알아보하고자 하였다.

1. 식물재료

DPE계 제초제에 내성 유전자로 알려진 *B. subtilis* Prottox 유전자를 담배와 Japonica형의 재배종 벼(*Oryza sativa* cv. Nakdong)에 형질전환시켜 재료로 사용하였다. 형질 전환된 담배 종자를 70% 에탄올에 30초간 처리한 후 50% 상업용 표백제에 20분간 침적하여 표면 살균하고 멸균 증류수로 3회 세척하여 100mg/ℓ의 kanamycin이 첨가된 MS 기본배지(Murashige & Skoog, 1962)에서 발아시켰다. 성장상에서 1개월 동안 생육시킨 개체 중 kanamycin에 저항성인 개체를 선발하여 원예용 상토와 vermiculite를 1:1(v:v)로 혼합한 토양을 담은 plastic cup에 이식하여 성장상에서 1주 동안 순화시킨 후 30±3/20±3℃(주/야)의 온실조건에서 성장시켰다. 야생형 담배(*Nicotinana tabacum* cv. Xanthi) 종자는 직접 파종하여 위의 조건에서 성장시켰다. 한편 ubiquitin promoter의 조절을 받는 *B. subtilis* Prottox 유전자를 세포질 또는 색소체에 발현하도록 하였다. 형질을 전환하지 않은 벼의 종자를 prochloraz 용액에 하루 동안 침지한 다음 2일간 최아시켜 벼 육묘용 상토를 담은 Wagner pot(1/5,000 a)에 파종하고 30±5/20±5℃(주/야)의 온실조건에서 분얼기까지 성장시켰다. 한편 형질전환 벼의 경우는 hygromycin(50mg/L)을 첨가한 2N6 배지에서 선발된 캘러스로부터 얻어진 형질전환 개체와 T1, T2 및 T3 종자를 위에 기술한 Wagner pot에 이식하여 30/20℃의 성장상에서 1주일 동안 순화시킨 후 위의 온실 조건에서 성장시켰다. 밀과 보리의 경우에도 위와 유사한 방법으로 성장시켰다.

2. Prottox 저해형 제초제에 대한 형질전환 벼와 재배종의 성장 반응

형질전환 벼 100여 line의 종자를 oxyfluorfen 농도(0.1 ~ 100 μM)에 2일간 침종하고 벼 육묘용 상토가 충전된 플라스틱 컵에 파종하였다. 파종 후 7일에 발아율과 유묘의 약해 정도를 달관평가하여 저항성 정도가 높은 계통을 선발하였다. 이렇게 선발된 형질전환 벼 line이 oxyfluorfen과 같이 Prottox 저해형 제초제로 알려진 cafentrazone과 oxadiazon에 대해서도 교차저항성이 있는지를 확인하였다. 이 실험을 위해 선발된 형질전환 벼 계통과 재배 종의 벼를 침종하고 최아시켜 사각 포트에 파종하였다. Carfentrazone(0, 6.25, 12.5, 25, 50 g ai/ha)과 oxadiazon(15, 30, 60, 120 g ai/ha)는 담수조건으로 토양처리하였고, oxyfluorfen(18, 36, 73, 146, 296,

587 g ai/ha)은 건답조건으로 토양표면 처리하였다. 처리는 파종 후 3일에 하였고, 처리 후 10일에 지상부 생체중을 측정하여 형질전환 벼와 재배종 벼간의 차이를 비교하였다.

3. 세포내 구성물질의 누출

위의 온실 조건에서 생육시킨 담배의 잎을 cork borer를 이용하여 만든 leaf disc(4mm diameter), 벼의 경우에는 각 개체별 잎을 면도칼을 이용하여 만든 절편을 5mL의 1% sucrose와 1mM MES buffer(pH 6.5)가 담겨져 있는 직경 6cm의 polystyrene Petri dish에 옮긴 후, carfentrazone과 oxyfluorfen을 acetone으로 녹여 원하는 농도가 되도록 Petri dish에 가하고 무처리구의 경우에는 같은 양만큼의 acetone을 가했다. 이때 acetone의 최종 농도가 1%(v/v)를 넘지 않도록 하였으며, 약제농도는 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 μ M로 하였다. 약제처리 후 25°C growth chamber에서 12시간 동안 암배양한 후 250 μ mol/m²/sec의 광을 조사하면서 conductivity meter(Cole-Parmer Instrument Co., Vernon Hills, IL, USA)를 이용하여 전해물질의 누출 정도를 2시간 간격으로 12시간 동안 측정하였다(Fig. 4-4). 측정 방법은 carfentrazone과 oxyfluorfen의 처리 농도에 따라 최초의 conductivity값이 다르므로 시간에 따른 conductivity의 변화를 수치로 나타내며, 처리구와 무처리구에서의 차이 값을 carfentrazone과 oxyfluorfen에 의한 conductivity의 증가로 표시하였다.

4. 엽록소 파괴

엽절편의 배양과 carfentrazone 및 oxyfluorfen의 처리는 전해물질의 누출을 측정할 때 사용한 방법과 동일하게 하였다. Oxyfluorfen을 처리한 엽절편을 25°C 암조건의 생장상에서 12시간 배양한 후 250 μ mol/m²/sec의 광을 24시간 동안 조사한 다음 Hiscox & Israelstam(1979)의 방법을 사용하여 엽록소 함량을 측정하였다. 광 조사 후 Petri dish에 있는 엽절편을 배양액과 분리하여 여과지로 흡습시킨 다음 시험관에 넣고 dimethyl sulfoxide를 용매로 하여 48시간 동안 암상태에서 엽록소를 추출한 후 흡광분광분석기로 645와 663nm에서 흡광도를 측정한 후 다음의 식에 의해 엽록소 함량을 계산하였다.

$$\text{Chlorophyll(mg/L)} = (20.2 \times A_{645} + 8.02 \times A_{663}) \times \text{dilution factor}$$

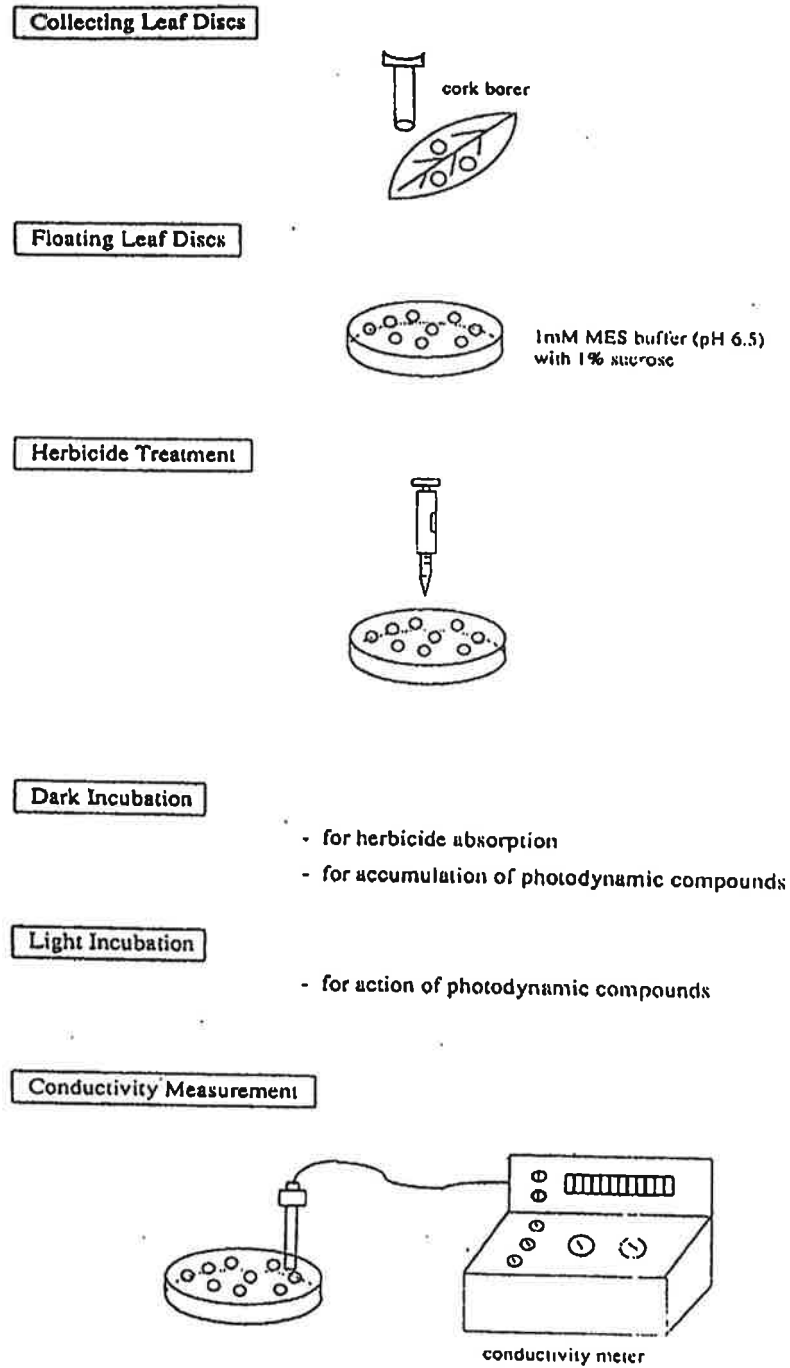


Fig. 4-4. Procedure for electrolyte leakage measurement

5. 세포막 지질과산화작용

지질과산화작용은 TBA 방법을 이용하여 MDA 생성량을 측정하여 조사하였다. 약제처리 및 배양조건은 전해물질 누출 및 엽록소량 측정시 사용한 조건과 동일하게 하였다. 그렇지만 이 경우에는 sucrose가 TBA와 반응하여 MDA의 측정을 간섭한다고 알려져 있으므로(Kenyon *et al.*, 1985) 배양액 조제시 sucrose는 첨가하지 않았다. 약제처리 후 25℃의 growth chamber에서 12시간 암배양한 후 $250 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 의 광도로 24시간동안 조사한 후 배양액과 엽 절편을 각각 분리하여 더 이상 약제에 의한 반응이 일어나지 않도록 MDA 생성량을 측정할 때까지 -80℃의 냉동고에 보관하였다. 냉동고에서 꺼낸 엽 절편은 막자사발에 넣고 20% TCA에 0.5% TBA가 용해되어 있는 용액을 5ml 넣어 마쇄한 다음, 20,000g의 속도로 15분간 원심분리하여 상정액을 취하였다. 이 상정액을 100℃에서 25분간 끓인 다음 ice bath에 넣어 냉각시킨 후 다시 20,000g의 속도로 15분간 원심분리하여 얻은 상정액을 흡광분광분석기를 이용하여 532nm에서 흡광도를 측정하였으며 600nm에서의 흡광도 값으로 보정하였다. 한편 배양액은 20% TCA에 0.5% TBA가 용해되어 있는 용액과 1:1(v/v) 비율로 하여 위와 같은 과정을 거친 후 흡광도를 측정하였다. MDA농도는 $156\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 의 molar extinction coefficient를 이용하여 산출하였다. 산출된 배양액과 엽절편의 MDA 농도를 합하여 dish 당으로 환산하여 총 MDA 농도로 나타내었다.

6. 광합성 측정

광합성은 CO₂ 주입기가 장착된 portable photosynthesis system(LI-6400, LI-COR, Lincoln, NE, USA)로 측정하였다. 외부로부터의 CO₂는 제거하고 CO₂ mixer regulator로 순수한 CO₂를 공급하여 원하는 농도가 되도록 하였다. Leaf chamber는 light-emitting diode 광원과 leaf temperature thermocouple으로 구성된 것을 사용하였고 광도의 조절을 위해서는 gallium arsenide phosphide quantum sensor를 이용하였다. 제4 본엽을 대상으로 하여 광합성을 측정하였는데 측정시 잎의 온도는 25℃로 유지하였다. 광합성은 0-2000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 의 광도조건과 0-1000 $\mu\text{mol}/\text{mol}$ 의 CO₂ 농도 조건에서 각각 5분간 적응시킨 후 측정하였다.

7. 엽록소 형광

엽록소 형광은 25℃에서 fluorescence induction monitor(FIM 1500, Analytical Development Co. Ltd., UK)를 사용하여 측정하였다. 측정하고자 하는 잎을 leaf clip 내에서 틸라코이드 막의 에너지화와 관련된 형광소멸을 유도하기 위해 30분 동안 암 상태에서 적응시킨 후 형광을 측정하였다. 최대변이형광(maximum variable fluorescence, Fv) 값은 최대형광(maximum fluorescence, Fm) 값으로부터 초기형광(intial fluorescence, Fo) 값을 뺀 값으로 구하였다. 이들 값으로부터 계산한 Fv/Fm 값을 광합성 과정의 광화학 반응의 잠재적 양자수율로 사용하였다.

8. Proto IX의 측정

Carfentrazone과 oxyfluorfen을 각각 1 μ M을 처리한 엽조직을 처리 후 4시간째에 0.1 g 채취하여 1 ml의 methanol: acetone: 0.1N NaOH(9:10:1, v/v)로 추출한 후 10,000 g에서 10분간 원심분리하여 상정액을 취하고 나일론 필터(0.2 μ m pore size)로 거른 후 사용하기 전까지 -20℃의 냉동고에 보관하였다. 제초제에 의해 측정되는 Proto IX의 양은 HPLC를 이용하여 측정하고 표준 Proto IX과 비교하였다(Matsumoto & Duke, 1990).

9. Protox 활성 측정

Protox 활성 측정은 Sherman 등(1991)의 방법에 의해 수행하였다. 이 효소의 기질인 Protogen IX은 아말감을 이용하여 Proto IX을 환원시켜 만들고(Jacobs & Jacobs, 1982) 만들어진 Protogen IX과 효소액을 반응시켜 단위시간당 생성되는 Proto IX을 HPLC를 이용하여 측정하였다. Carfentrazone과 oxyfluorfen에 의한 활성의 저해를 조사하기 위하여 이 제초제가 0.1 μ M 첨가된 효소액을 사용하였다.

10. 항산화효소 활성 측정

- 조효소액 제조

조효소액은 동결된 잎 0.5g을 5ml의 100mM potassium phosphate buffer pH 7.5(2mM EDTA, 1% PVP-40, 1mM PMSF가 함유)을 넣어 막자사발로 균질화 시켜 추출하였다.

단, ascorbate peroxidase(AP)의 추출 buffer는 위의 buffer 조성외에 5mM ascorbate가 포함되었다. Insoluble 물질은 4℃에 20분간 15,000 g로 원심분리하여 제거하고 그 상침액을 조효소액으로 사용하였다. Protein 함량은 BSA을 표준으로한 Bradford(1976) 방법에 준하여 측정한다.

- 항산화효소 분석

CAT 활성은 Mishra 등(1993)의 방법에 준하여 측정하였다. 반응액은 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)와 11 mM H₂O₂로 하며, CAT 활성은 효소추출액을 넣고 1분간 240 nm에 흡광도 변화로 측정하였다.

POD 활성은 Egley등(1983)의 방법에 준하여 470 nm에서 측정하였다. 반응액은 40 mM potassium phosphate buffer(pH 6.9), 1.5 mM guaiacol 및 6.5 mM H₂O₂로 하였으며, POD 활성은 추출한 효소액을 넣어 1분간 흡광도 변화로 측정하였다.

APX 활성은 Chen과 Asada(1989)의 방법을 사용하여 ascorbate의 산화정도를 290 nm에서 1분간 흡광도 감소로 측정하여 나타냈다. 반응액은 100 mM potassium phosphate buffer(pH 7.5), 0.05 mM ascorbate 및 0.2 mM H₂O₂로 하였다. GR활성은 Rao 등(1996)의 방법을 사용하여 340 nm에서 흡광도 감소를 측정하였다. 반응액은 100 mM potassium phosphate buffer(pH 7.8), 2 mM EDTA, 0.2 mM NADPH, 0.5 mM GSSG로 조성하였다.

제 3 절 연구 결과 및 고찰

1. Oxyfluorfen에 대한 재배종 담배의 엽기별 반응

엽기별로 볼 때 어린 잎일수록 oxyfluorfen에 의한 전해물질의 누출이 크게 나타났다. DPE계 제초제 oxyfluorfen에 의한 담배잎으로부터의 전해물질의 누출은 광조건에서 배양시간이 경과됨에 따라 증가되었다(Fig. 4-5). 식물체로의 제초제 흡수 및 plastid의 Protox의 저해로 인한 광활성 물질인 Protox IX의 축적이 이루어질 수 있도록 광이 처리되기 전 암조건에서 12시간 동안 배양하였다. 또한 광조건하에서 나타나는 전해물질의 누출은 3~4엽기의 경우, 농도에 따라 2~6시간의 이러한 lag

phase는 엽기가 늘어날수록 크게 나타났다(Fig. 4-5). 이 lag phase 동안에는 축적된 Proto IX으로부터 광에 의해 발생하는 singlet oxygen(1O_2)이 식물체 자체가 갖고 있는 방어기작에 의해 무독화되므로 원형질막의 파괴가 일어나지 않으나(Orr & Hess, 1981) singlet oxygen의 발생이 계속되면 이러한 방어기작에 의한 singlet oxygen의 무독화가 더 이상 이루어지지 않아 singlet oxygen에 의한 원형질막의 파괴가 일어나게 되고 그 결과 전해물질의 누출이 증가되는 것으로 생각되었다.

여러 농도의 oxyfluorfen을 처리한 담배잎을 암상태에서 12시간 배양한 후 광조건에서 전해물질의 누출을 측정한 결과, oxyfluorfen의 농도가 증가함에 따라 전해물질의 누출이 증가되었으며 반응의 lag phase도 단축되었다(Fig. 4-6).

Oxyfluorfen에 대한 엽록소 함량의 감소도 엽기별 어린 잎일수록 크게 나타났다(Fig. 4-7). 7~8엽기의 잎의 경우에는 oxyfluorfen에 의한 엽록소 함량의 감소가 이루어지지 않은 반면 3~4엽기의 잎에서는 $10\mu M$ 의 oxyfluorfen 처리로 약 40%의 엽록소가 파괴되었다.

DPE계 제초제는 식물의 porphyrin 합성과정의 식물체내에 Protox를 저해하여 Proto IX이 비정상적으로 축적되게 하는 것으로 알려져 있다. Proto IX은 빛을 흡수하여 분자산소로부터 일중항 산소를 만드는 광활성 물질이다. 일중항 산소는 반응성이 매우 높아 전자가 많은 곳을 공격하게 되는데 세포막의 주요 구성 성분인 불포화 지방산을 공격하여 막지질 과산화작용(membrane lipid peroxidation)을 일으킨다.

막의 지질 과산화작용은 불포화 지방산으로부터 수소이온이 이탈되면서 이루어진다. 즉 자유라디칼(free radical)이 세포막의 불포화 지방산을 공격하면 수소원자가 이탈하게되어 탄소원자에 전자가 남게 되고, 이러한 탄소나 지질라디칼(lipid radical)은 산소와 반응하여 과산화수소 라디칼(hydroperoxy radical)이 형성되며 이것이 다른 불포화 지방산으로부터 수소원자를 이탈시킬 수 있어서 지질 과산화작용의 연쇄반응이 일어나게 된다(Fig. 4-8). 궁극적으로 틸라코이드의 불포화 지방산은 MDA와 ethane으로 분해되며, 이러한 연쇄반응에 의해 틸라코이드의 구조가 파괴되고 여러 다른 세포막과 조직들이 붕괴되는 것으로 알려져 있다.

이와 같이 oxyfluorfen의 처리에 의한 지질 과산화작용의 지표로 MDA 생성량을 조사하였는데, MDA의 생성은 oxyfluorfen을 $0.1\mu M$ 이상의 농도로 처리했을 때 이루어

졌으며 $10\mu\text{M}$ 이상의 농도에서는 MDA생성량이 더 이상 늘어나지 않는 경향이였다 (Fig. 4-9). Oxyfluorfen에 의한 MDA의 생성량도 담배잎의 엽기에 따라 크게 좌우되었는데 oxyfluorfen에 의한 전해물질의 누출이나 엽록소 파괴의 경우에서와 마찬가지로 3~4엽기의 어린 잎에서의 MDA생성량이 가장 크게 나타났으며 5~6엽기와 7~8엽기 앞에서의 MDA생성량은 서로 유의한 차이가 나타나지 않았다.

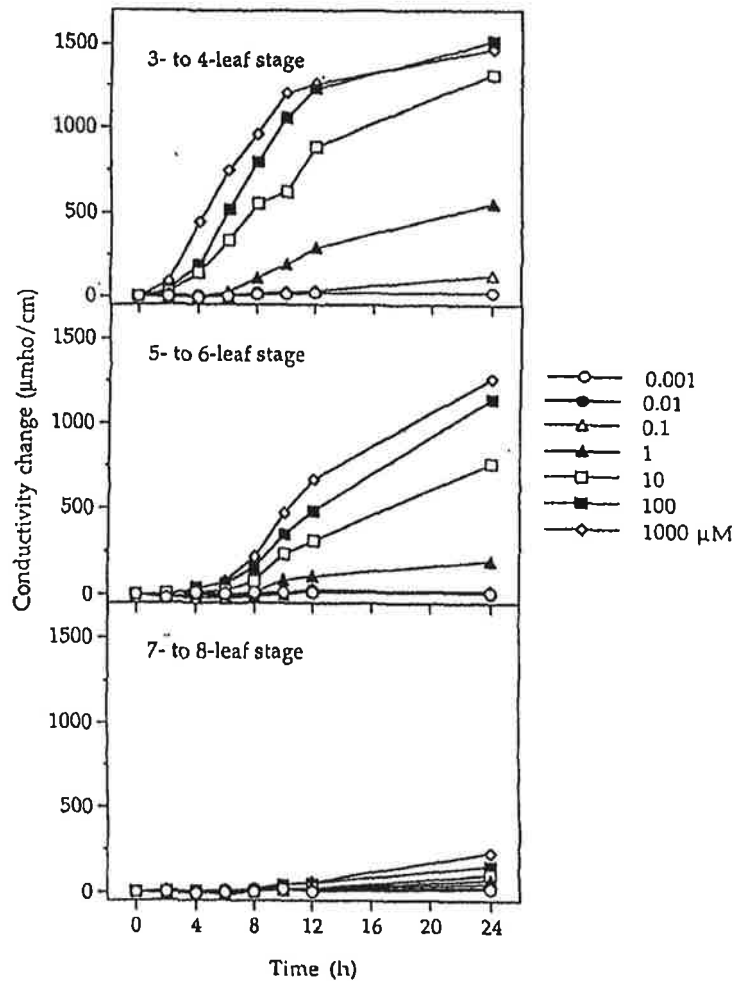


Fig. 4-5. Effect of various concentrations of oxyfluorfen on electrolyte leakage from tobacco leaf discs of different leaf stage upon exposure to continuous light at $250\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ at 25°C following 12 h dark incubation. Values are differences between treated and control tissues.

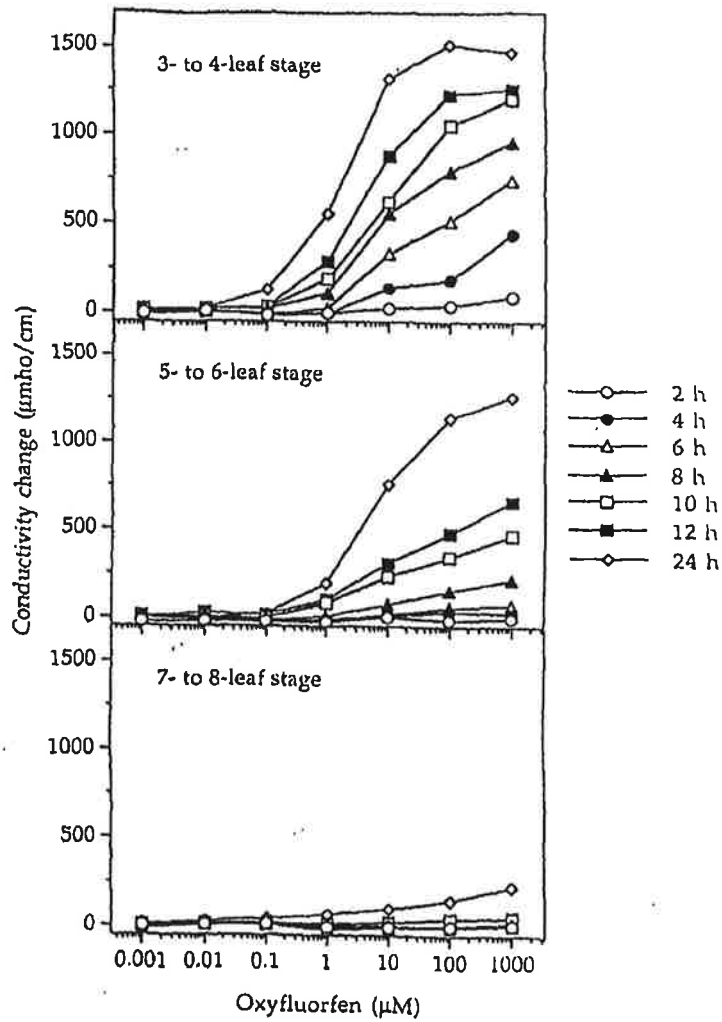


Fig. 4-6. Effect of light incubation period on electrolyte leakage from tobacco leaf discs of different leaf stage treated with various concentrations of oxyfluorfen. The tissues were exposed to continuous light at $250 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ at 25°C following 12 h dark incubation. Values are differences between treated and control tissues.

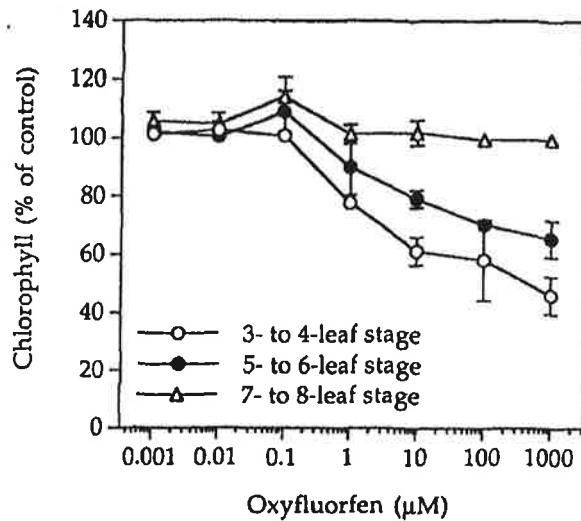


Fig. 4-7. Effect of oxyfluorfen on chlorophyll content of tobacco leaf discs of different leaf stage. The tissues were exposed to continuous light at $250 \mu \text{mol/m}^2/\text{sec}$ at 25°C for 24 h following 12 h dark incubation. Error bars are ± 1 standard error of the means. In some cases the error bar is obscured by the datum symbol.

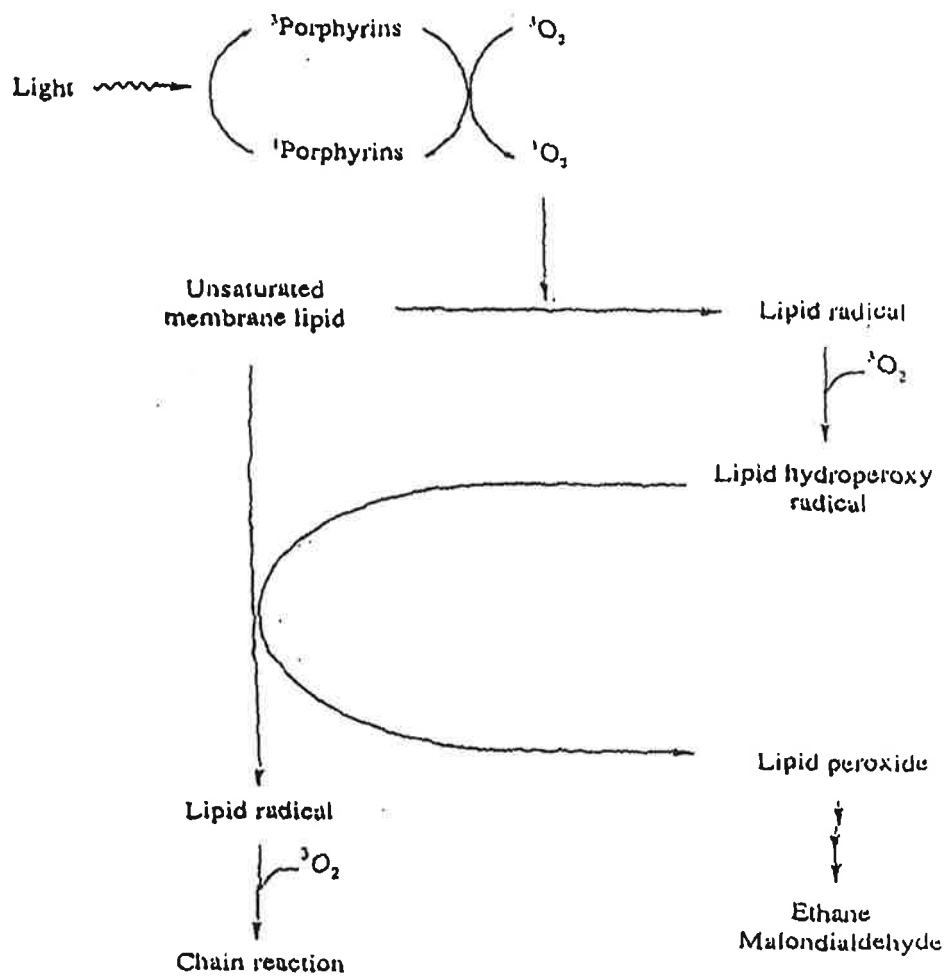


Fig. 4-8. Chain reaction of membrane lipid peroxidation mediated by Proto IX

이상의 결과에서 살펴본 바와 같이 세포내 전해물질의 누출, 엽록소 파괴 및 MDA 생성량을 측정함으로써 oxyfluorfen의 효과를 효율적으로 조사할 수 있었으며 담배잎에서의 이러한 oxyfluorene의 효과는 잎의 엽기에 따라 크게 달라짐을 알 수 있었고, 엽기가 어린 잎 일수록 oxyfluorfen의 효과가 더욱 크게 나타났다. 따라서 이 이후의 형질전환 담배를 이용한 실험에서는 엽령이 동일한 3~4엽기의 담배 잎을 대상으로 하여 수행하였다.

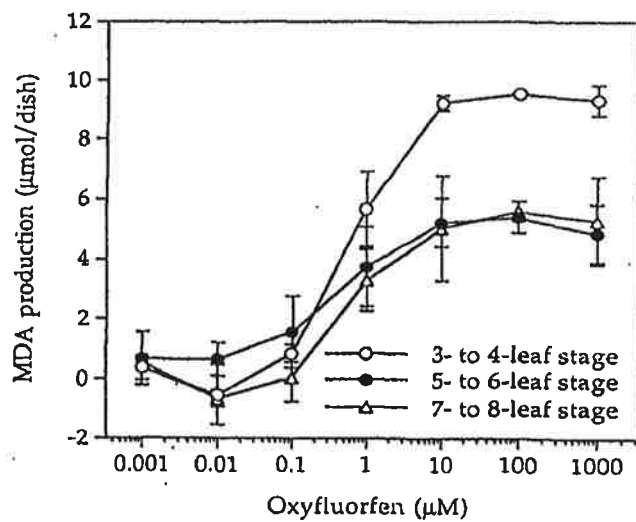


Fig. 4-9. Effect of oxyfluorfen on MDA production from tobacco leaf discs of different leaf stage. The tissues were exposed to continuous light at $250 \mu \text{mol/m}^2/\text{sec}$ at 25°C for 24 h following 12 h dark incubation. Error bars are ± 1 standard error of the means. In some cases the error bar is obscured by the datum symbol.

2. Oxyfluorfen에 대한 야생형 담배와 형질전환 담배의 생리학적 반응 비교

B. subtilis Protox 유전자를 발현시킨 형질전환 line 3, 4 및 16의 담배의 oxyfluorfen에 대한 생리학적 반응을 야생형 담배와 비교하였다. Oxyfluorfen에 의한 세포내 전해물질의 누출은 형질전환 담배 line 4를 제외하고는 모두 야생형 담배에서 보다 작게 이루어졌다(Fig. 4-10). 즉 재배종 담배의 경우 $100 \mu\text{M}$ 의 oxyfluorfen을 처리하고 빛을 12시간 조사한 후의 conductivity 변화량은 약 $1000 \mu\text{mho/cm}$ 인 반면

line 3과 line 16의 경우에는 각각 약 700 및 600 $\mu\text{mho}/\text{cm}$ 의 수준이었다. Oxyfluorfen에 대한 재배종 담배와 형질전환 담배의 이러한 차이는 oxyfluorfen의 처리 농도가 높아지거나 처리 시간이 길어짐에 따라 더욱 크게 나타나는 경향이였다 (Fig. 4-10).

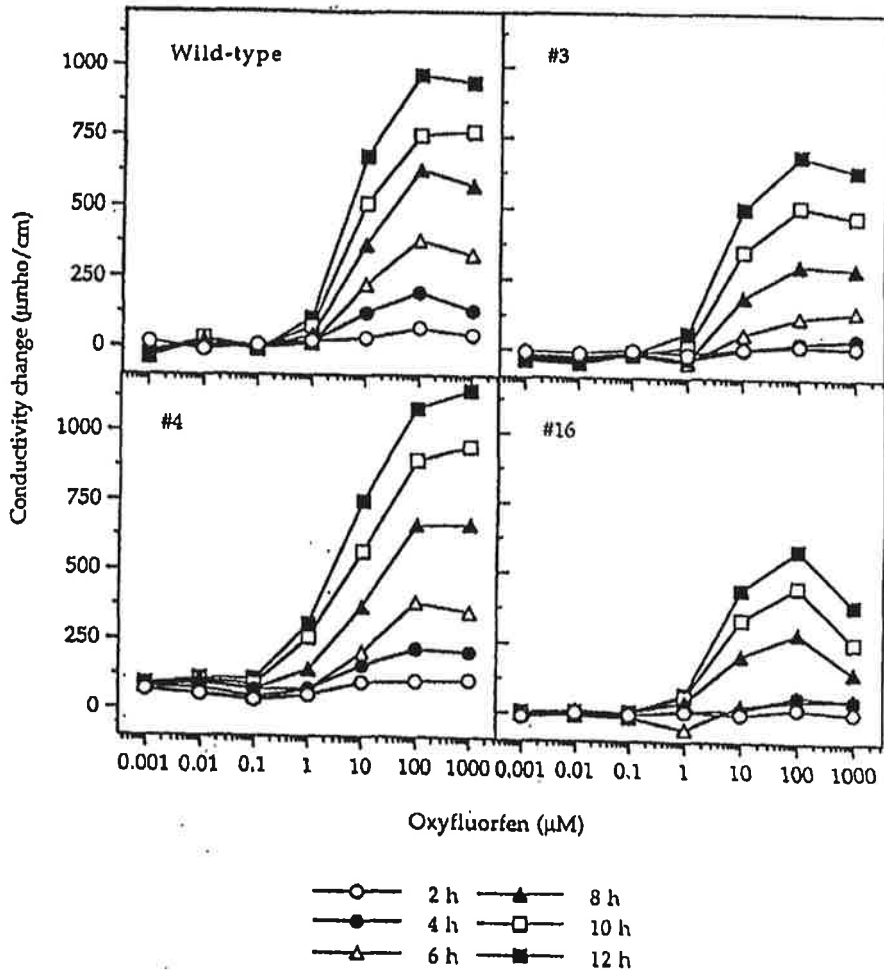


Fig. 4-10. Effect of oxyfluorfen on electrolyte leakage from leaf discs of wild-type and transgenic tobacco plants. The tissues were exposed to continuous light at $250 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ at 25°C following 12 h dark incubation. Values are differences between treated and control tissues.

Oxyfluorfen에 의한 엽록소 함량 감소의 경우에서도 마찬가지로 형질전환 담배 line 4를 제외하고 모두 재배종 담배에서보다 작게 이루어졌다(Table 4-1).

Table 4-1. Effect of 1mM oxyfluorfen on chlorophyll loss in leaf discs of nontransgenic and transgenic tobacco plants. Chlorophyll contents were determined after 24 hr of exposure to 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ photosynthetically active radiation at 25°C following 12 h dark incubation. Values are the means with 1 standard error of triplicate experiments.

Plant tissue	Chlorophyll loss (%)
Nontransgenic	45.6 \pm 4.92
#3	26.6 \pm 4.14
#4	50.3 \pm 2.20
#16	32.8 \pm 1.45

Oxyfluorfen의 효과를 막지질 과산화작용의 지표인 MDA생성량으로 조사한 결과 oxyfluorfen을 10 μM 이상의 농도로 처리하였을 때 형질전환 담배 line 3의 경우 야생형 담배에서보다 더 작게 나타나 형질이 전환된 담배가 oxyfluorfen에 더 둔감한 반응을 보였다(Fig. 4-11).

그러므로 재배종 담배와 비교해 볼 때 형질이 전환된 담배는 세포내 전해물질의 누출, 엽록소 파괴 및 지질 과산화작용 등 모든 측면에서 oxyfluorfen에 저항성을 나타내어 *B. subtilis* Prottox 유전자가 담배에서 발현되었음을 뒷받침할 수 있었다.

3. Oxyfluorfen에 대한 밀의 내성 기작

Fig. 4-11에 나타낸 바와 같이 밀은 보리에 비하여 뚜렷한 내성을 나타내었으며 토양처리의 경우 밀에 대한 oxyfluorfen의 I_{50} 값이 보리에 대한 값보다 2.3배 높았다. Oxyfluorfen의 경엽처리하였을 경우에는 토양에 처리하였을 때보다 밀과 보리의 감수성 차이가 더욱 뚜렷하게 나타났다. 경엽처리시의 oxyfluorfen의 I_{50} 값은 토양처리시보다 월등하게 낮았으나 밀과 보리의 I_{50} 값의 차이는 더욱 뚜렷하여 밀에 대한 I_{50} 값이 보리에 대한 값보다 약 8배 높게 나타났다(Fig. 4-12).

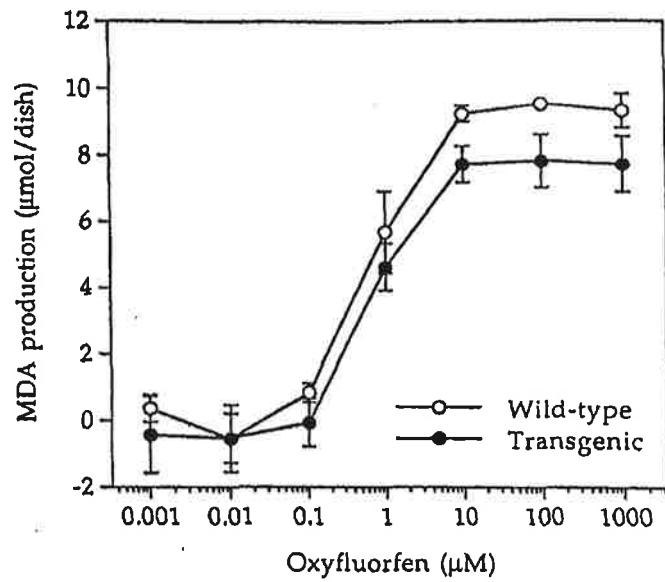


Fig. 4-11. Effect of oxyfluorfen on MDA production from leaf discs of nontransgenic and transgenic (#3) tobacco plants. The tissues were exposed to continuous light at $250 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ at 25°C for 24 h following 12 h dark incubation. Error bars are ± 1 standard error of the means. In some cases the error bar is obscured by the datum symbol.

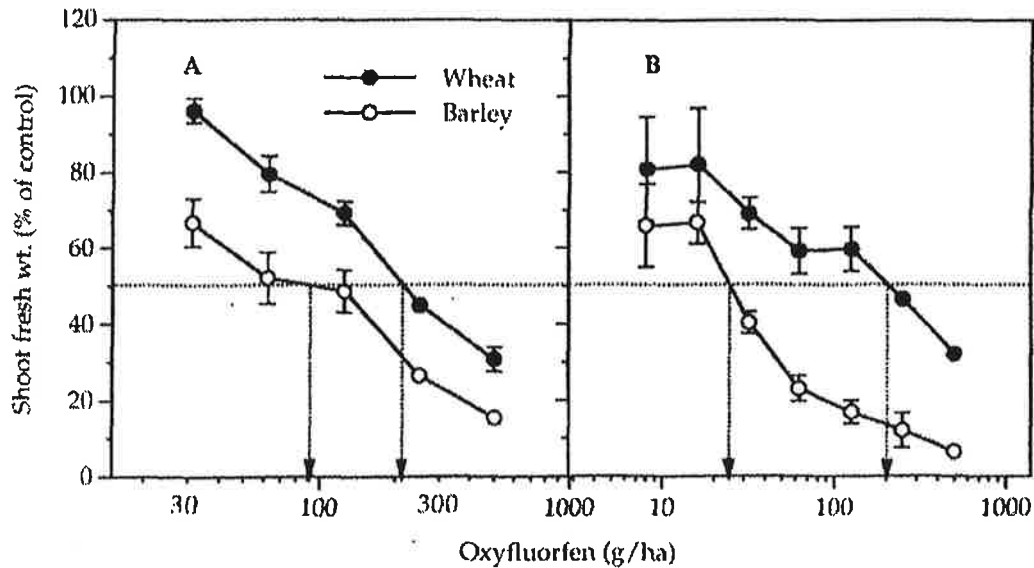


Fig. 4-12. Effect of (A) preemergence (B) postemergence treatment of oxyfluorfen on wheat and barley in a greenhouse. Error bars are ± 1 SE of the means. In some cases the error bar is obscured by the symbol.

온실 실험에서 나타난 밀과 보리의 감수성 차이는 *in vitro* 실험에서도 확인되었다. Oxyfluorfen의 처리 농도에 따른 엽 절편으로부터의 시간별 전해물질의 누출은 밀보다 보리에서 뚜렷하게 이루어졌으며 보리의 경우 oxyfluorfen을 $0.33 \mu\text{M}$ 이상의 농도로 처리하였을 때 전해물질의 누출이 증대되었다(Fig. 4-13). Oxyfluorfen에 의한 엽록소의 파괴도 마찬가지로 경향을 나타내어 밀의 경우 $1 \mu\text{M}$ oxyfluorfen의 처리로도 엽록소의 파괴가 미미하였으나 보리의 경우에는 전해물질 누출의 경우에서처럼 $0.33 \mu\text{M}$ 이상의 농도로 처리하였을 때 엽록소 함량이 크게 감소하였다(Fig. 4-14). 지질과산화작용의 지표인 MDA의 생성은 $0.33 \mu\text{M}$ 이상의 oxyfluorfen을 처리하였을 때 이루어졌는데 밀의 경우 $10 \mu\text{M}$ 의 oxyfluorfen의 처리로 보리의 약 50% 수준만의 MDA가 생성되었다(Fig. 4-15).

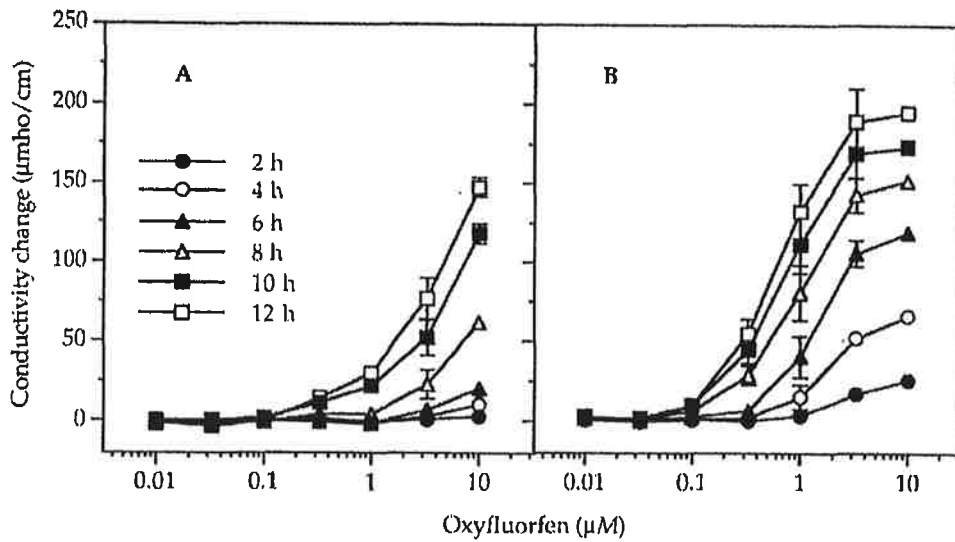


Fig. 4-13. Effect of oxyfluorfen on cellular leakage from leaf squares of (A) wheat and (B) barley. The tissues were exposed to continuous light at $120 \mu \text{mol/m}^2/\text{s}$ PAR at 25°C following 12 h of dark incubation. Values are the differences between treated control tissues. Error bars are ± 1 SE of the means. In some cases the error bar is obscured by the symbol.

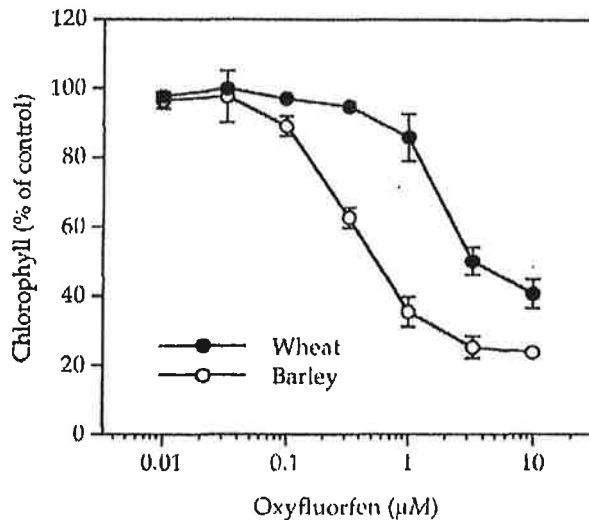


Fig. 4-14. Effect of oxyfluorfen on chlorophyll contents of wheat and barley leaf squares. The tissues were exposed to continuous light at $120 \mu \text{mol/m}^2/\text{s}$ PAR at 25°C for 24 h following 12 h of dark incubation. Error bars are ± 1 SE of the means. In some cases the error bar is obscured by the symbol.

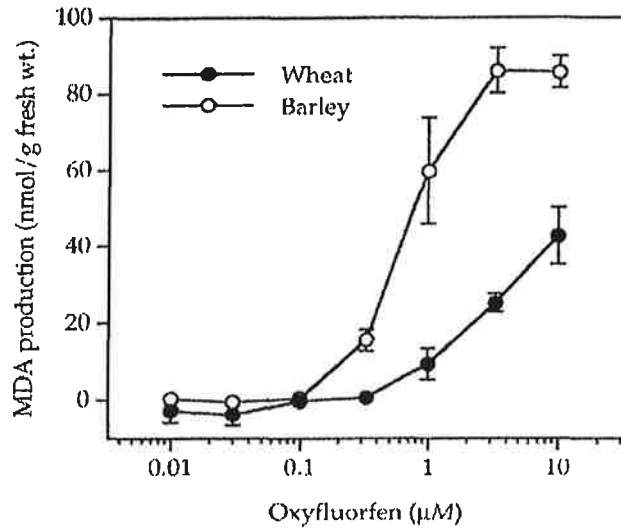


Fig. 4-15. Effect of oxyfluorfen on MDA production in wheat and barley leaf squares. The tissues were exposed to continuous light at 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ PAR at 25°C following 12 h of dark incubation. Error bars are ± 1 SE of the means. In some cases the error bar is obscured by the symbol.

Oxyfluorfen의 처리농도에 따라 Proto IX이 밀과 보리의 잎에 축적되었는데 축적 정도가 밀에 비해 보리에서 더욱 뚜렷하였다. 즉 1 또는 10 μM 의 oxyfluorfen을 처리하였을 때 보리의 잎에 축적되는 Proto IX의 양은 밀에 비해 1.9와 1.5배 더 크게 나타났다(Fig. 4-16). Oxyfluorfen을 처리하지 않았을 때 밀과 보리로부터 추출한 etioplast의 Protox 활성은 각각 15.5와 17.7 nmol Proto IX formed/h/mg protein으로 비슷하게 나타났다. 그러나 oxyfluorfen 처리에 의해 보리 etioplast의 Protox 활성이 밀에 비해 크게 저해되었다. Protox 활성에 대한 밀과 보리의 I_{50} 값은 각각 0.2와 0.06 μM 이었다. 보리의 Protox는 oxyfluorfen의 처리 농도가 증대됨에 따라 크게 저해되었으나 밀의 경우에는 0.33 μM 이상의 oxyfluorfen의 처리 농도로는 더 이상의 Protox 저해가 이루어지지 않았다(Fig. 4-17).

그러므로 oxyfluorfen에 대한 밀과 보리의 감수성 차이는 이 제초제에 의한 Protox의 저해 차이에 기인하는 것으로 생각되며 이러한 사실이 밀이 이 제초제에 비교적 내성을 나타내는 이유로 설명되리라 추측된다.

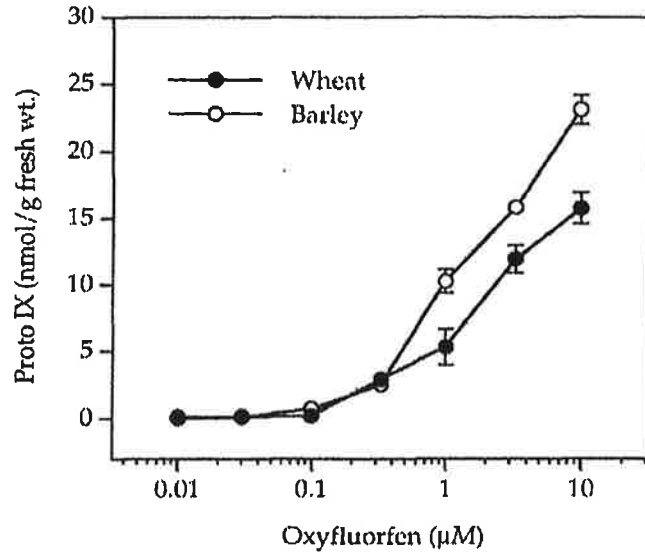


Fig. 4-16. Effect of oxyfluorfen on Proto IX accumulation in wheat and barely leaf squares after 12 h of dark incubation at 25°C. Error bars are ± 1 SE of the means. In some cases the error bar is obscured by the symbol.

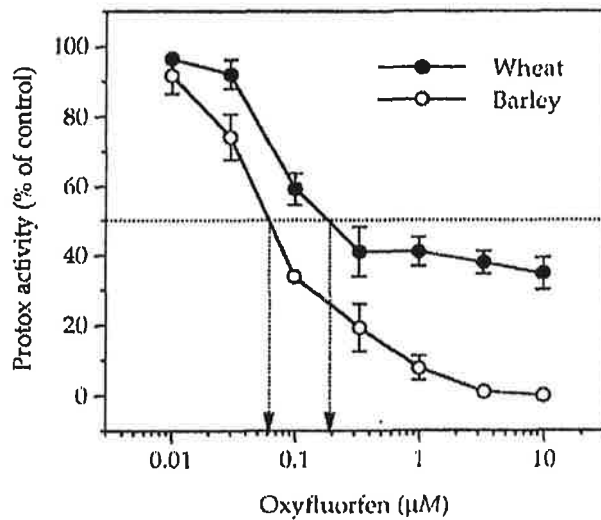


Fig. 4-17. Effect of oxyfluorfen on Prototox activity in wheat and barely leaf squares after 12 h of dark incubation at 25°C. Error bars are ± 1 SE of the means. In some cases the error bar is obscured by the symbol.

4. Oxyfluorfen에 대한 형질전환 벼의 생리학적 반응

가. CaMV 35S promoter를 이용하여 만든 형질전환 벼에 대한 oxyfluorfen의 효과

CaMV 35S promoter를 이용하여 *B. subtilis* Protox를 화성벼의 세포질에 전이시켜 만든 형질전환 벼에 대한 oxyfluorfen의 효과를 재배종 벼의 경우와 비교한 결과 엽록소의 파괴 및 세포막의 지질과산화작용 모두 유의한 차이가 나타나지 않아(Figs. 4-18, 19) CaMV 35S promoter를 이용한 경우 *B. subtilis* Protox 유전자가 성공적으로 세포질내로 전이되지 못한 것으로 생각되었다.

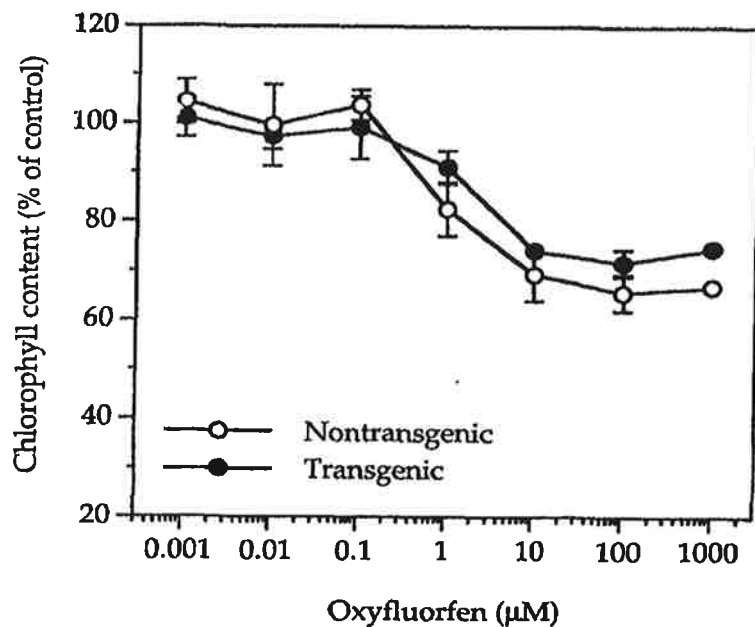


Fig. 4-18. Effect of oxyfluorfen on chlorophyll loss in leaf squares of nontransgenic and transgenic rice (cv. Hwasung) plants. The tissues were exposed to continuous light at $250 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ at 25°C for 24 h following 12 h dark incubation. Error bars are ± 1 SE of the means. In some cases the error bar is obscured by the symbol.

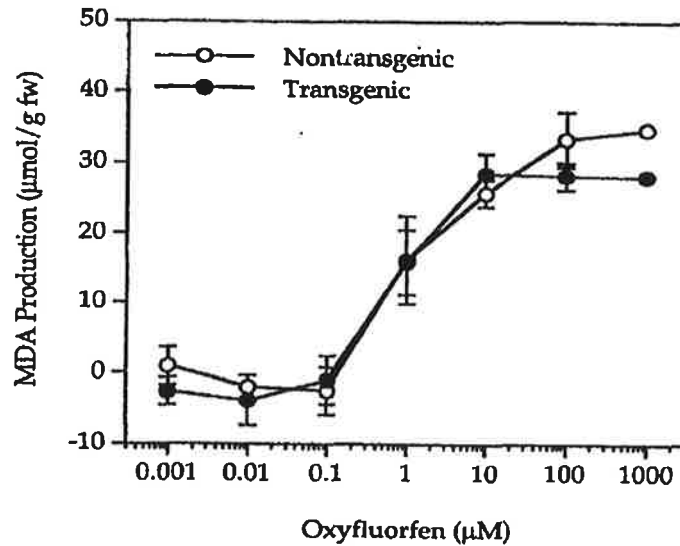


Fig. 4-19. Effect of oxyfluorfen on MDA production from leaf squares of nontransgenic and transgenic rice (cv, Hwasung) plants. The tissues were exposed to continuous light at $250 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ at 25°C for 24 h following 12 h dark incubation. Error bars are ± 1 SE of the means. In some cases the error bar is obscured by the symbol.

나. Ubiquitin promoter의 조절을 받는 *B. subtilis* Protoc 유전자 형질전환 벼에 대한 oxyfluorfen의 효과

1) T_0 세대

DPE계 제초제인 oxyfluorfen에 대한 형질을 전환한 벼와 전환하지 않은 벼의 반응을 세포내 전해물질의 누출과 엽록소 파괴로 비교하였다. Oxyfluorfen을 처리한 엽절편을 25°C 의 암조건의 성장상에서 12시간 배양한 후 $250 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 의 빛을 12시간 동안 조사한 결과 형질을 전환하지 않은 벼의 엽절편으로부터 전해물질의 누출이 크게 이루어졌다(Figs. 4-20, 21). 이러한 세포내 전해물질의 누출은 oxyfluorfen의 농도가 증가함에 따라 더욱 크게 이루어졌다. 그러나 형질을 전환한 엽절편으로부터의 전해물질의 누출은 형질을 전환하지 않은 엽절편으로부터의 전해물질의 누출에 비해 매우 낮게 나타났다(Figs. 4-20, 21). Oxyfluorfen에 대한 이러한 반응은 *B. subtilis* Protoc 유전자를 세포질에 발현시켜 형질을 전환한 벼에 비해 색소체에

targeting하여 형질을 전환한 벼에서 더욱 낮게 나타나는 경향이었다(Figs. 4-20, 21). *B. subtilis* Prottox 유전자가 세포질에서 발현되는 형질전환 벼의 경우에는 oxyfluorfen에 대한 저항성이 나타나지 않는 line도 관찰되었다. 예를 들어 C-1 형질 전환체의 경우에는 oxyfluorfen에 대해 형질을 전환하지 않은 벼와 거의 동일한 수준의 반응을 나타내었다(Fig. 4-20).

형질을 전환한 벼와 형질을 전환하지 않은 벼의 엽절편에서 oxyfluorfen의 처리에 의해 이루어지는 엽록소 함량의 감소도 세포내 전해물질의 누출의 경우와 비슷한 경향이었다. Oxyfluorfen은 형질을 전환하지 않은 벼의 엽절편에 있는 엽록소의 함량을 농도에 따라 효과적으로 감소시킨 반면 *B. subtilis* Prottox 유전자를 세포질에 발현시키거나 색소체에서 발현하는 형질전환 벼의 엽절편에서는 엽록소함량의 감소가 이루어지지 않았다(Figs. 4-22, 23). 이러한 결과로부터 형질전환 낙동벼가 T_0 세대에서 oxyfluorfen에 저항성을 나타내며 색소체에서 발현하는 형질전환 벼가 세포질에서 발현하는 형질전환 벼보다 더 높고 균일한 저항성을 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

2) T_1 및 T_2 세대

DPE계 제초제인 oxyfluorfen에 대한 형질을 전환한 벼와 전환하지 않은 벼의 반응을 광활성 제초제의 효과를 비교하는 데 주로 사용되는 세포내 전해물질의 누출, 엽록소 파괴 및 지질과산화작용의 최종산물인 MDA의 생성량으로 비교하였다. 세포질에 *B. subtilis* Prottox 유전자를 발현시켜 형질을 전환한 line 중 대표적인 line으로 C1, C2, C5, C6와 plastid에 *B. subtilis* Prottox 유전자를 발현시켜 형질을 전환한 line 중 대표적인 line으로 P1, P3, P4, P15를 대상으로 실험을 수행하였다. Oxyfluorfen을 처리한 엽 절편을 25°C의 암 조건의 성장상에서 12시간 배양한 후 $250 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 의 빛을 12시간 동안 조사한 결과 형질을 전환하지 않은 벼의 엽 절편으로부터 전해물질의 누출이 크게 이루어졌다(Fig. 4-24). 이러한 세포내 전해물질의 누출은 oxyfluorfen의 농도가 증가함에 따라 더욱 크게 이루어졌다. 그러나 형질을 전환한 엽 절편으로부터의 전해물질의 누출은 형질을 전환하지 않은 엽 절편으로부터의 전해물질의 누출에 비해 매우 낮게 나타났다(Fig. 4-24). Oxyfluorfen에 대한

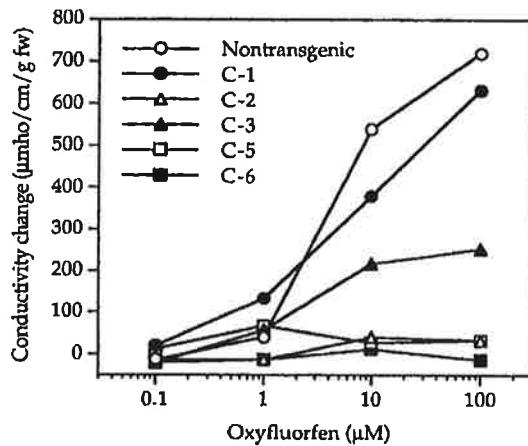


Fig. 4-20. Effect of oxyfluorfen on electrolyte leakage from leaf squares of nontransgenic and transgenic rice (cv. Nakdong) plants. Letter C indicates that *B. subtilis* Protox gene would be expressed in the cytosol and the following numbers represent the individual transgenic lines. The tissues were exposed to continuous light at $250 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ at 25°C for 12 h following 12 h dark incubation. Values are differences between treated and control tissues.

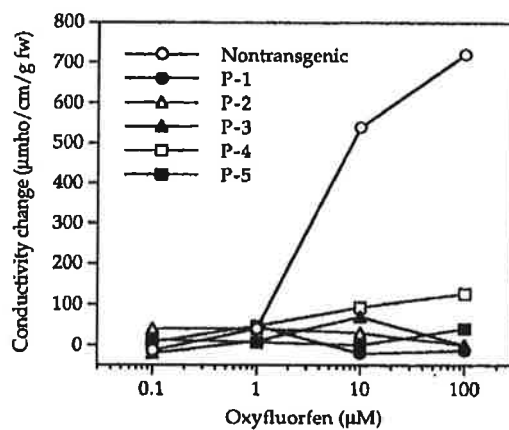


Fig. 4-21. Effect of oxyfluorfen on electrolyte leakage from leaf squares of nontransgenic and transgenic rice (cv. Nakdong) plants. Letter P indicates that *B. subtilis* Protox gene would be expressed in the plastid and the following numbers represent the individual transgenic lines. The tissues were exposed to continuous light at $250 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ at 25°C for 12 h following 12 h dark incubation. Values are differences between treated and control tissues.

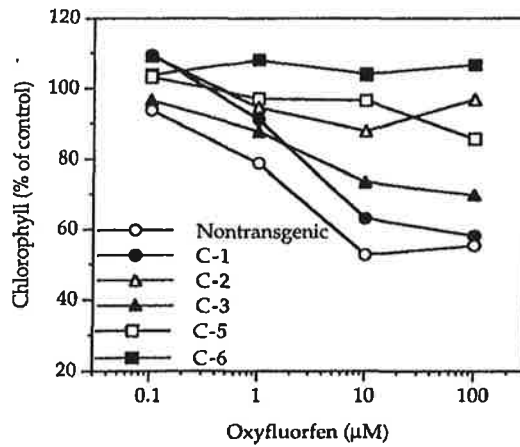


Fig. 4-22. Effect of oxyfluorfen on chlorophyll loss from leaf squares of nontransgenic and transgenic rice (cv. Nakdong) plants. Letter C indicates that *B. subtilis* Protox gene would be expressed in the cytosol and the following numbers represent the individual transgenic lines. The tissues were exposed to continuous light at 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ at 25°C for 24 h following 12 h dark incubation.

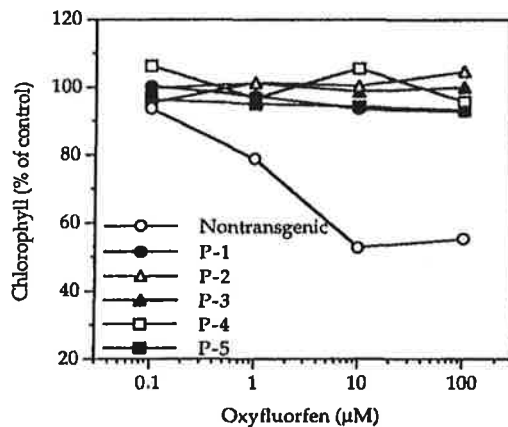


Fig. 4-23. Effect of oxyfluorfen on chlorophyll loss from leaf squares of nontransgenic and transgenic rice (cv. Nakdong) plants. Letter P indicates that *B. subtilis* Protox gene would be expressed in the plastid and the following numbers represent the individual transgenic lines. The tissues were exposed to continuous light at 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ at 25°C for 24 h following 12 h dark incubation.

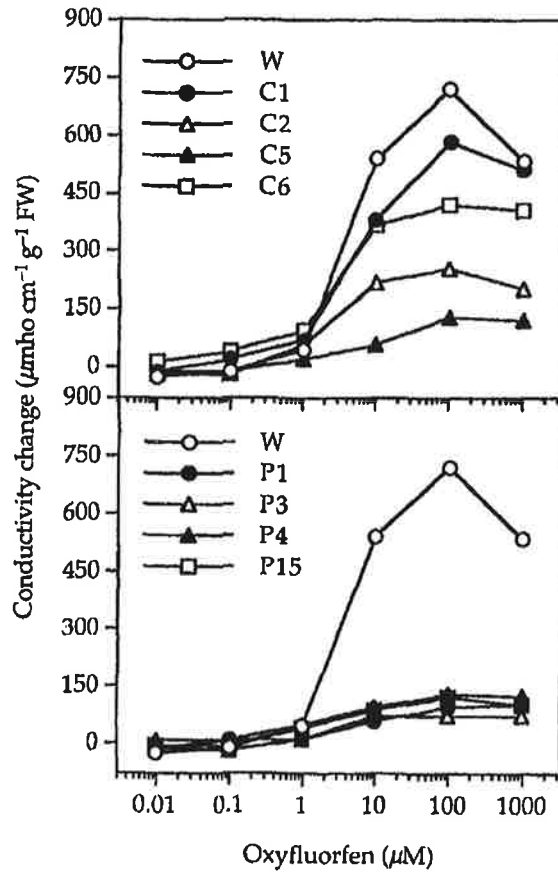


Fig. 4-24. Effect of oxyfluorfen on cellular leakage from leaf squares of the nontransgenic and the transgenic rice plants. W, nontransgenic rice plants; C1-C6, transgenic lines of cytoplasm targeted; P1-P15, transgenic lines of plastid targeted.

이러한 반응은 *B. subtilis* Prottox 유전자를 세포질에 발현시켜 형질을 전환한 벼에 비해 plastid에 targeting하여 형질을 전환한 벼에서 더욱 낮게 나타나는 경향이 있었다(Fig. 4-24). *B. subtilis* Prottox 유전자를 세포질에 발현시켜 형질을 전환한 벼의 경우에는 oxyfluorfen에 대한 저항성이 나타나지 않았다. 예를 들어 C-1 형질전환의 경우에는 oxyfluorfen에 대해 형질을 전환하지 않은 벼와 거의 동일한 수준의 반응을 나타내었다(Fig. 4-24).

형질을 전환한 벼와 형질을 전환하지 않은 벼의 엽 절편에서 oxyfluorfen의 처리에 의해 이루어지는 엽록소 함량의 감소도 세포내 전해물질의 누출의 경우와 비슷한 경향이였다. Oxyfluorfen은 형질을 전환하지 않은 벼의 엽 절편에 있는 엽록소의 함량을 농도에 따라 효과적으로 감소시킨 반면 *B. subtilis* Prottox 유전자를 세포질에 발현시키거나 plastid에 targeting하여 형질을 전환한 벼의 엽 절편에서는 엽록소 함량의 감소가 이루어지지 않았다(Fig. 4-25). 또한 형질을 전환하지 않은 벼의 엽 절편에서는 oxyfluorfen의 처리에 따른 지질과산화작용이 현저하게 이루어졌으며 그 정도는 oxyfluorfen의 농도에 따라 다르게 나타남을 알 수 있었다(Fig. 4-26). 그러나 oxyfluorfen의 처리에 따른 지질과산화작용은 세포질에 *B. subtilis* Prottox 유전자를 발현시켜 형질을 전환한 경우에는 형질을 전환하지 않은 벼의 경우에 비해 매우 낮게 나타났으며 plastid에 *B. subtilis* Prottox 유전자를 발현시켜 형질을 전환한 경우에는 이러한 oxyfluorfen의 처리에 따른 지질과산화작용이 거의 이루어지지 않았다(Fig. 4-26).

이러한 결과로부터 ubiquitine promoter를 이용하여 *B. subtilis* Prottox 유전자를 발현시켜 형질을 전환한 낙동벼가 oxyfluorfen에 저항성을 나타내며 plastid에 *B. subtilis* Prottox 유전자를 발현시켜 형질을 전환한 벼가 세포질에 발현시켜 형질을 전환한 벼보다 *in vitro* 상태에서 더 높고 균일한 저항성을 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

한편, 형질전환에 따른 광합성능의 변화가 나타나는지 알아보기 위해 형질을 전환한 T₂ 세대의 벼와 형질을 전환하지 않은 벼의 광합성능을 조사하여 비교하였다. 광도를 달리한 조건에서 광합성능을 측정한 결과 세포질이나 plastid에 *B. subtilis* Prottox 유전자를 발현시켜 형질을 전환한 벼는 형질을 전환하지 않은 벼나 형질전환

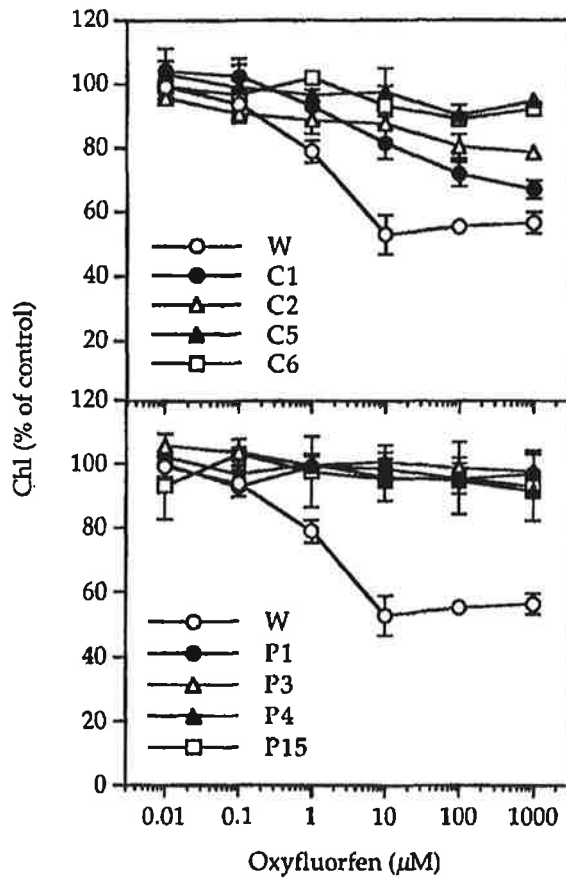


Fig. 4-25. Effect of oxyfluorfen on Chl loss from leaf squares of the nontransgenic and the transgenic rice plants. W, nontransgenic rice plants; C1-C6, transgenic lines of cytoplasm targeted; P1-P15, transgenic lines of plastid targeted. The tissues were exposed to continuous light at $250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ at 25°C for 12 h following 12 h dark incubation.

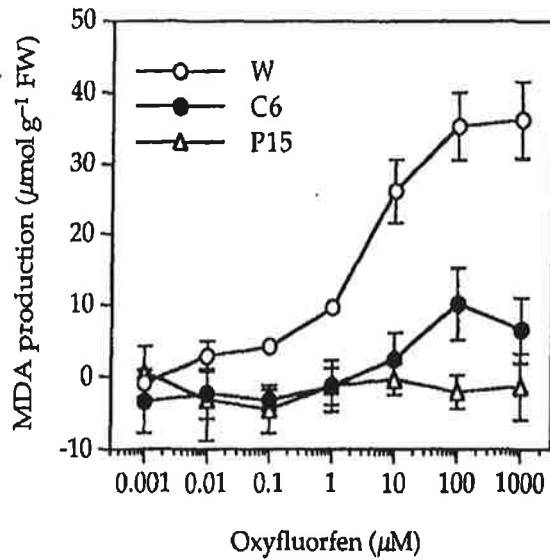


Fig. 4-26. Effect of oxyfluorfen on MDA production in leaf squares of the nontransgenic and the transgenic rice plants. W, nontransgenic rice plants; C6, transgenic lines of cytoplasm targeted; P15, transgenic lines of plastid targeted. The tissues were exposed to continuous light at $250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ at 25°C for 12 h following 12 h dark incubation.

대조 (transgenic control) 벼에 비해 다소 높은 경향이었으나 통계적 유의차는 나타나지 않았다(Fig. 4-27). 이들로부터 측정된 광합성능은 약 $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 이상의 광도조건에서는 더 이상의 광합성이 이루어지지 않았으며 $25 \pm 5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 광합성량을 나타내었다. 형질을 전환하지 않은 벼는 형질을 전환한 벼 모두 광합성의 광포화점은 대략 $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 으로 추정되었다. 또한 CO_2 농도를 달리하여 광합성을 측정된 경우에서도 형질을 전환한 벼와 형질을 전환하지 않은 벼의 광합성능은 위의 결과와 유사하였으며 광합성의 CO_2 포화점은 약 $700 \mu\text{mol/mol}$ 으로 추정되었다(Fig. 4-28).

측정한 엽록소 형광 값으로부터 계산한 Fv/Fm 값으로 광합성 효율을 추정하였는데 이 경우에서도 형질을 전환한 벼와 형질을 전환하지 않은 벼와의 유의한 차이는 나타나지 않았다(Table 4-1). 이들 Fv/Fm 값은 엽록소 형광의 측정대상으로 한 식물체 모두 0.8 이상의 비교적 높게 나타나 이들 식물체가 건강한 상태에 있었음을 확인하였다. 이러한 Fv/Fm 값은 이들 식물체의 생육시기에 따른 변화는 없었다. 그러므로 *B. subtilis* Protox 유전자의 발현으로 형질을 전환한 식물체의 광합성능 또는 광합성효율의 변화가 나타나지 않았음을 확인하였다.

3) T3 세대

B. subtilis Protox 유전자를 세포질 및 색소체에 전이시켜 형질을 전환한 100여 계통 중 oxyfluorfen에 대표적으로 내성을 보인 세포질 및 색소체에서 발현하는 각각 2 계통을 최종 선발하여 oxyfluorfen과 같이 Protox 저해제인 carfentrazone과 oxadiazon를 처리하여 이들 형질전환 계통과 재배종과의 성장량 반응, 세포내 전해물질의 누출, 엽록소 파괴 및 지질과산화작용의 최종산물인 MDA의 생성량, Proto IX 축적, Protox 활성 및 항산화효소 활성 차이를 알아보았다. Oxyfluorfen에 선발된 형질전환 계통들은 재배종과 형질전환 control(TC)에 비해 carfentrazone과 oxyfluorfen 처리에 의해 성장량 감소가 적었으나, 세포질과 색소체에 전이시킨 형질 전환 계통간에는 큰 차이가 없었다. 그러나 oxadiazon 처리에 의해서는 형질전환 계통들과 재배종 벼와는 차이가 없었다(Fig. 4-29). 따라서 이후의 생리적 반응에 관한 실험은 carfentrazone과 oxyfluorfen을 대상으로 하였다. 형질전환 벼의 잎으로부터 추출한

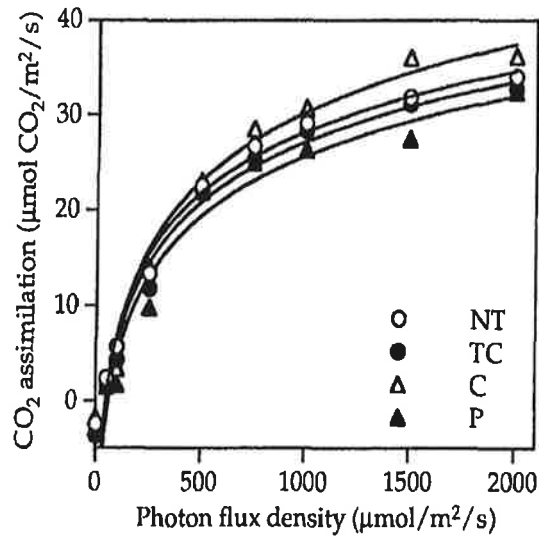


Fig. 4-27. Photosynthetic activities of the transgenic and the nontransgenic rice plants (cv. Nakdong) of T2 generation at various photon flux densities. The photosynthetic activities were measured on the 4th true leaves of the plants at 4 weeks after transplanting. CO₂ concentration was set at 400 µmol/mol. NT, nontransgenic rice plants; TC, transgenic control; C, transgenic lines of cytoplasm targeted; P, transgenic lines of plastid targeted.

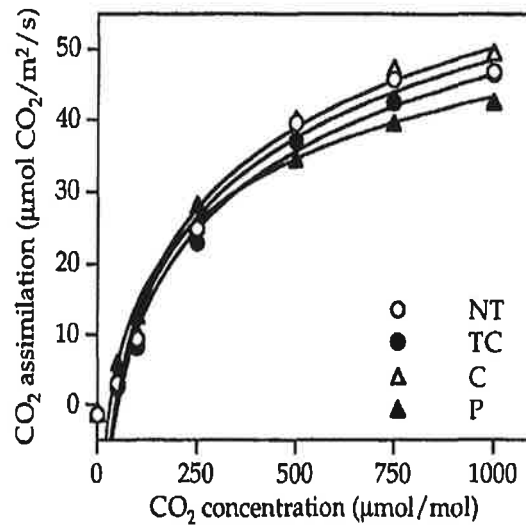


Fig. 4-28. Photosynthetic activities of the transgenic and the nontransgenic rice plants (cv. Nakdong) of T₂ generation at various CO₂ concentrations. The photosynthetic activities were measured on the 4th true leaves of the plants at 4 weeks after transplanting. Photon flux density was set at 1000 µmol/m²/sec. NT, nontransgenic rice plants; TC, transgenic control; C, transgenic lines of cytoplasm targeted; P, transgenic lines of plastid targeted.

Table 4-1. Photosynthetic efficiency of the transgenic and the nontransgenic rice plants (cv. Nakdong) of T₂ generation at different growth stages. WAT, weeks after transplanting; NT, nontransgenic plants; TC, transgenic control plants; C13, cytosol targeted transgenic plants; P9, plastid targeted transgenic plants.

WAT	Photosynthetic efficiency (Fv/Fm)			
	NT	TC	C13	P9
6	0.821	0.821	0.819	0.809
7	0.818	0.818	0.821	0.825
8	0.824	0.814	0.823	0.820

계놈 DNA는 세포질 및 색소체로 유전자를 전이시킨 계통에서 *B. subtilis* Prottox 유전자가 존재함을 확인하였고(Fig. 4-30), Northern 분석의 결과, 형질전환 벼에서 *B. subtilis* Prottox 유전자의 전사가 이루어졌으며 이 유전자를 세포질에서 발현시킨 벼보다 색소체에서 발현시킨 벼가 더 높은 경향을 보였다(Fig. 4-31). Carfentrazone과 oxyfluorfen에 의한 재배종 벼의 잎으로부터의 전해물질의 누출은 이들 제초제의 농도가 증가함에 따라 크게 증대되었다(Fig. 4-32). 그러나 *B. subtilis* Prottox 유전자 전이 형질전환 벼로부터의 전해물질의 누출은 재배종 벼에서보다 작게 이루어졌다. 특히 색소체에 *B. subtilis* Prottox 유전자를 발현시켜 형질을 전환한 벼의 경우 이들 두 제초제에 의한 전해물질의 누출은 *B. subtilis* Prottox 유전자를 세포질에 발현시킨 것보다 적게 나타내었다. 엽록소 함량의 감소는 형질전환 벼에 비해 재배종 벼와 TC에서 크게 나타났으나 전해질 누출에서 보인 결과와 달리 *B. subtilis* Prottox 유전자를 세포질과 색소체에 발현간에는 큰 차이가 없거나 세포질에 발현된 경우가 색소체에 발현시킨 경우보다 carfentrazone과 oxyfluorfen에 의한 엽록소 함량의 감소가 다소 컸다(Fig. 4-33). 지질과산화작용의 지표로 MDA 생성량을 조사하였는데, carfentrazone과 oxyfluorfen에 의한 MDA의 생성량도 전해물질의 누출이나 엽록소의 경우에서와 마찬가지로 형질전환 벼에서 뚜렷하게 나타나지 않았으며 *B. subtilis* Prottox 유전자를 세포질에 발현시킨 벼의 경우보다 색소체에 발현시킨 벼가 carfentrazone에 의한 MDA 생성이 더욱 작게 나타났으나 oxyfluorfen에서는 색소체와 세포질 발현간에 차이가 없었다(Fig. 4-34). Protoporphyrin 축적은 무처리에서는 형질전환 계통과 재배종 벼간에 큰 차이가 없었다(Fig. 4-35). 한편 1 μ M carfentrazone과 oxyfluorfen 처리시 재배종 벼에서는 protoporphyrin IX 축적량은 각각 4.7과 7.6 nmol/g fw를 보여 무처리보다 각각 3배와 5배 많았다. 그러나 형질전환 벼 계통들은 이들 두 제초제 처리에 의한 protoporphyrin IX 축적량은 재배종 벼보다 적었다. 또한 색소체에 발현된 계통이 세포질에 발현된 계통보다 이들 두 제초제에서 protoporphyrin IX 축적량 다소 적었다. Prottox 효소 활성은 무처리 상태에서의 형질전환 벼는 재배종 벼보다 다소 활성이 높고, 0.1 μ M carfentrazone과 oxyfluorfen 처리로 재배종 벼는 형질전환 벼보다 Prottox 활성 저해 정도가 컸다(Fig. 4-36). 그리고 색소체에 발현된 경우가 세포질에 발현된 경우에 비해 두 제초

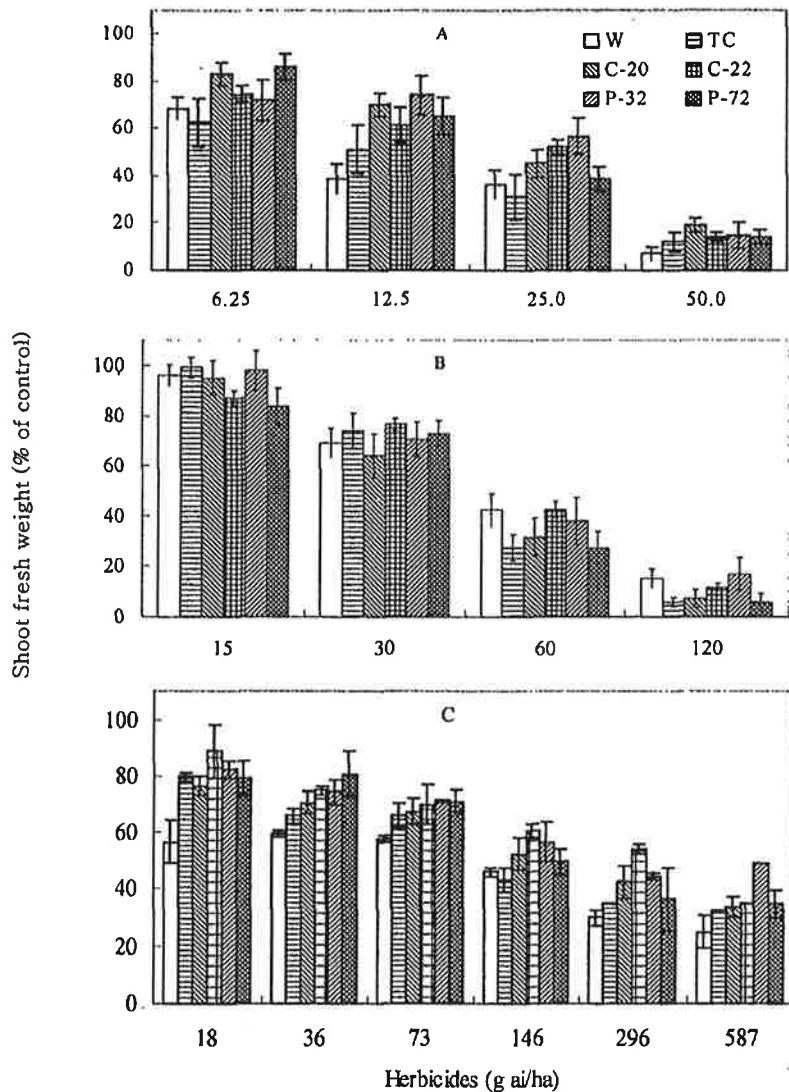


Fig. 4-29. Shoot fresh weight of nontransgenic and transgenic rice plants of the T3 generation to carfentrazone (A), oxadiazon (B), and oxyfluorfen (C). W, nontransgenic rice plants; TC, transgenic control; C-20 and C-22, transgenic line of cytoplasm targeted; P-32 and P-72, transgenic line of plastid targeted. Carfentrazone and oxadiazon were treated at 3 days after seeding (DAS) in wet-seeding. However, oxyfluorfen was treated at 3 DAS in direct seeding on dry paddy. Shoot fresh weight was measured at 10 days after treatment. The average shoot fresh weight of the control, W, TC, C-20, C-22, P-32, and P-72 was 1.69, 1.47, 1.73, 1.80, 1.50, and 1.67 g/15 plants, respectively.

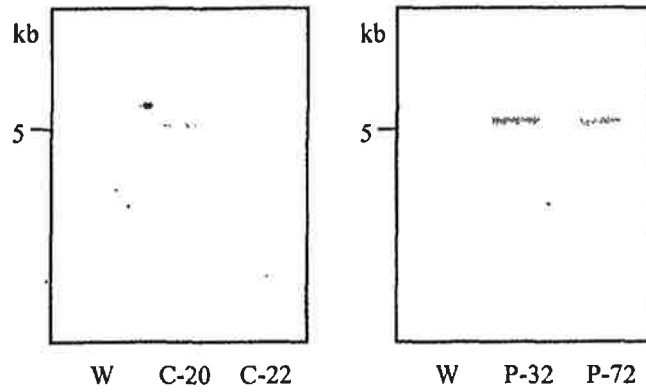


Fig. 4-30. Southern blot analysis of nontransgenic and the transgenic rice plants (cv. Nakdong) of the T3 generation. W, nontransgenic rice plants; C-20 and C-22, transgenic line of cytoplasm targeted; P-32 and P-72, transgenic line of plastid targeted.

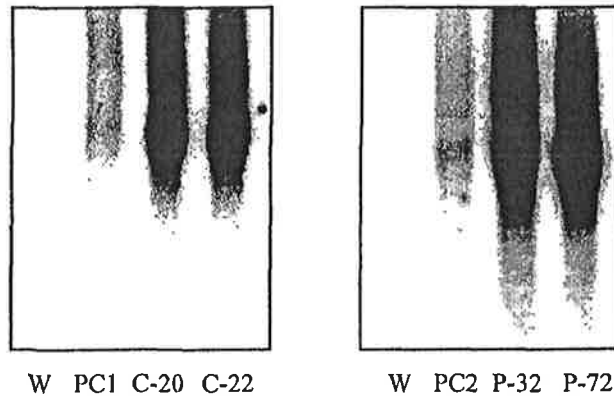


Fig. 4-31. Northern blot analysis of nontransgenic and the transgenic rice plants (cv. Nakdong) of the T3 generation. W, nontransgenic rice plants; PC1 and PC2 positive control expressed in cytoplasm and plastid, respectively; C-20 and C-22, transgenic line of cytoplasm targeted; P-32 and P-72, transgenic line of plastid targeted.

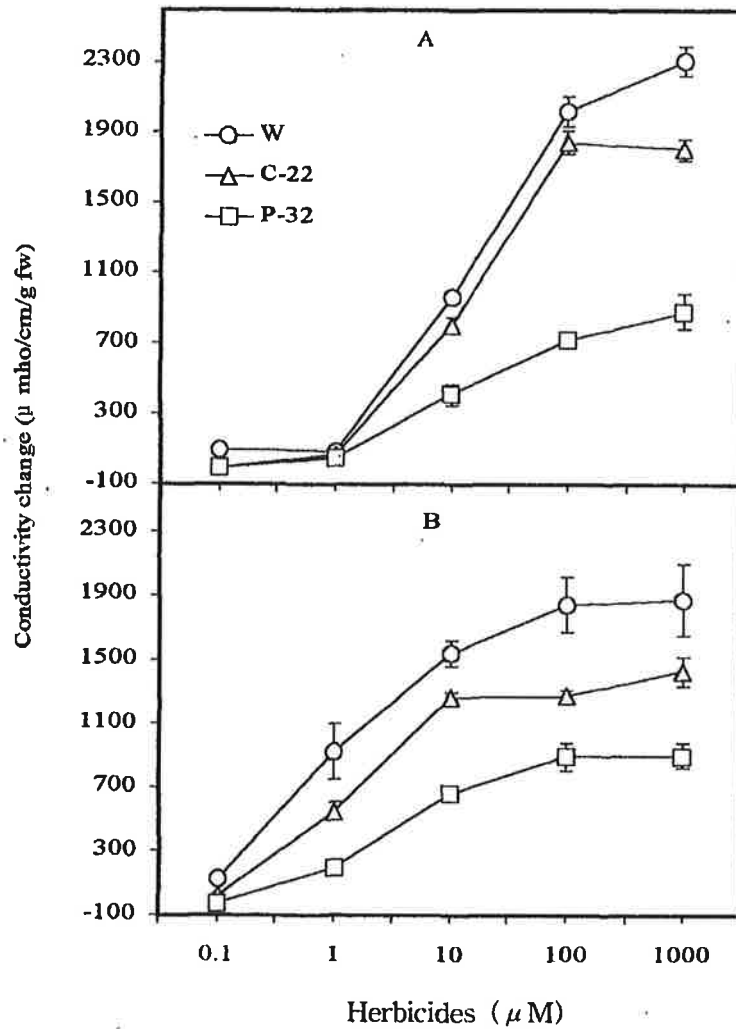


Fig. 4-32. Effect of carfentrazone (A) and oxyfluorfen (B) on electrolyte leakage from leaf squares of the nontransgenic and the transgenic rice plants of the T3 generation. W, nontransgenic rice plants; C-22, transgenic line of cytoplasm targeted; P-32, transgenic line of plastid targeted. The tissues were exposed to continuous light at $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ at 25°C for 24 h following 12 h dark incubation. Values are differences between treated and control tissues.

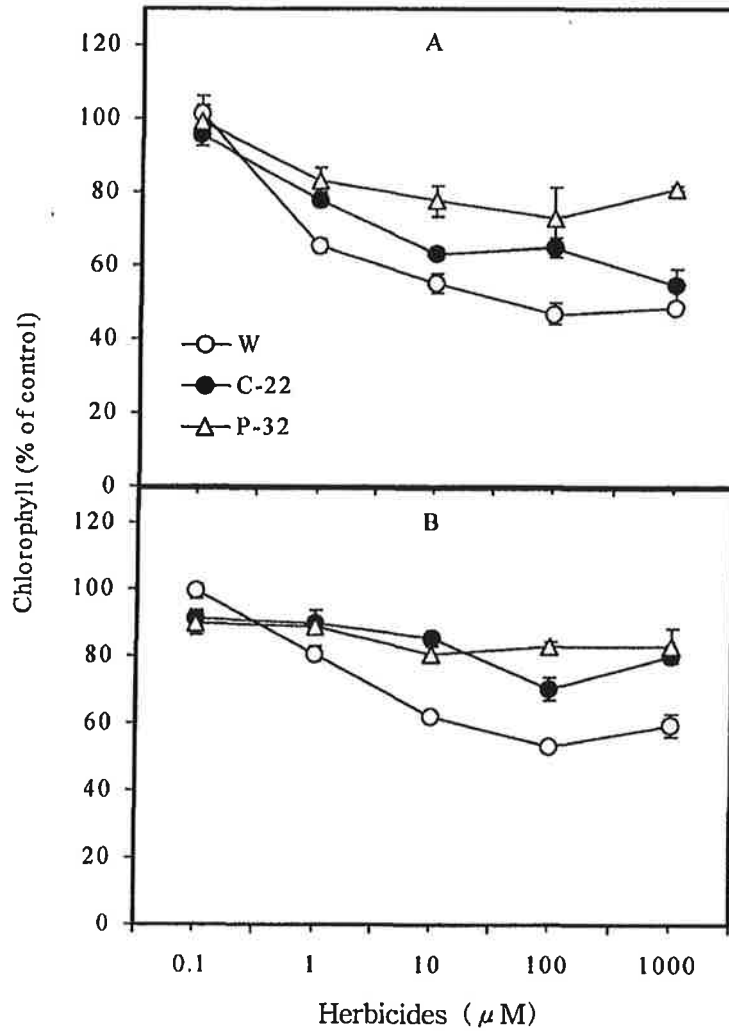


Fig. 4-33. Effect of carfentrazone (A) and oxyfluorfen (B) on chlorophyll loss in leaf squares of the nontransgenic and the transgenic rice plants of the T3 generation. W, nontransgenic rice plants; C-22, transgenic line of cytoplasm targeted; P-32, transgenic line of plastid targeted. The tissues were exposed to continuous light at $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ at 25°C for 24 h following 12 h dark incubation.

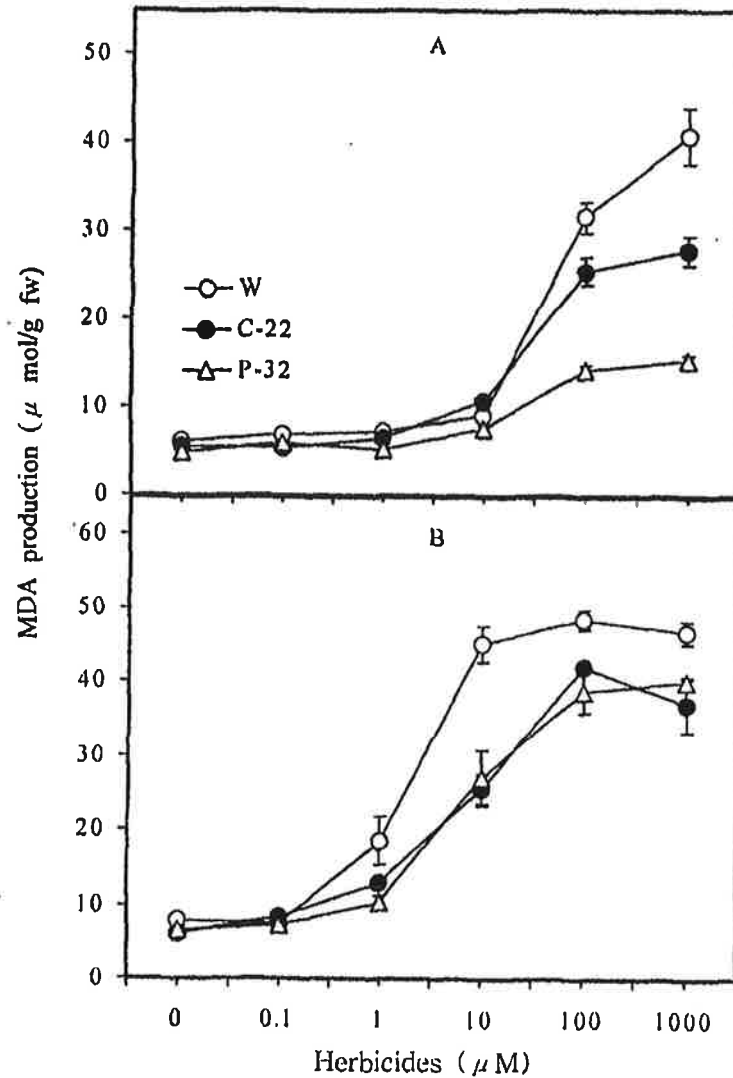


Fig. 4-34. Effect of carfentrazone (A) and oxyfluorfen (B) on MDA production from leaf squares of the nontransgenic and the transgenic rice plants of the T3 generation. W, nontransgenic rice plants; C-22, transgenic line of cytoplasm targeted; P-32, transgenic line of plastid targeted. The tissues were exposed to continuous light at $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ at 25°C for 24 h following 12 h dark incubation. Values are differences between treated and control tissues.

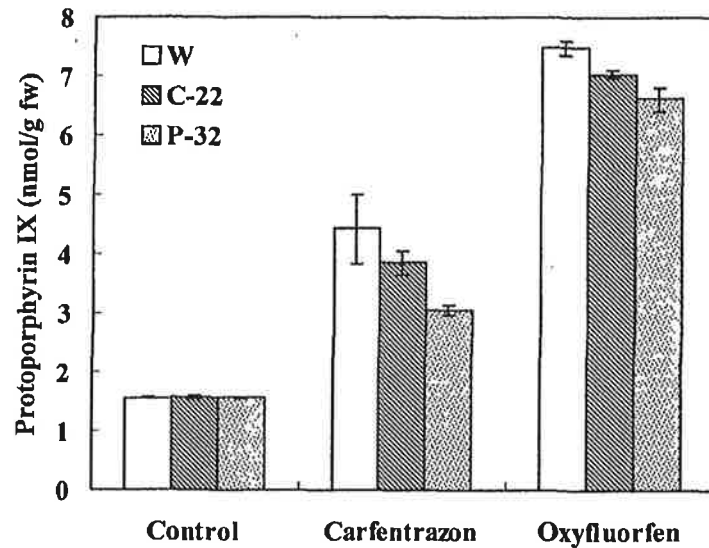


Fig. 4-35. Effect of carfentrazone and oxyfluorfen on protoporphyrin IX content of the nontransgenic and the transgenic rice plants of the T3 generation. W, nontransgenic rice plants; C-22, transgenic line of cytoplasm targeted; P-32, transgenic line of plastid targeted. Shoots of the plants were soaked in $1 \mu\text{M}$ herbicides solution for 2 hr in the dark and 4 hrs exposure to light at $150 \mu\text{mol/m}^2/\text{sec}$ at 25°C .

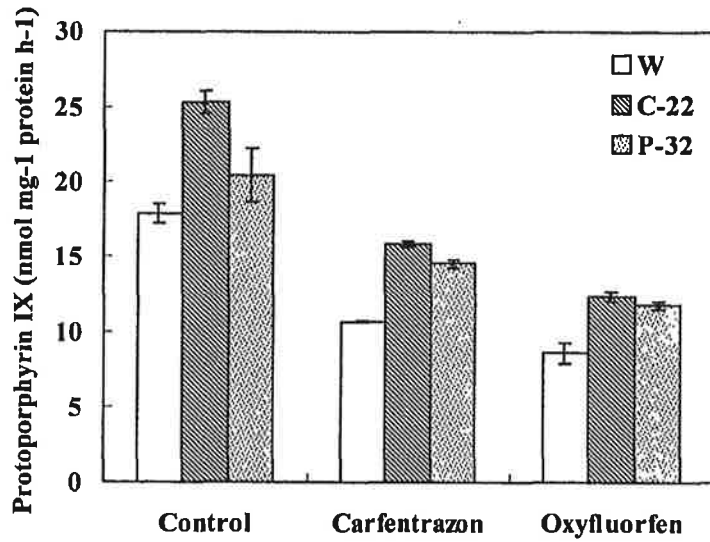


Fig. 4-36. Protox enzyme activity in crude chloroplast extracts of the nontransgenic and the transgenic rice plants of the T3 generation. W, nontransgenic rice plants; C-22, transgenic line of cytoplasm targeted; P-32, transgenic line of plastid targeted. Enzyme activity were measured without and with 0.1 μ M herbicides.

제 처리에 의한 Prottox 활성 저해가 적었다. 또한 형질전환 벼와 재배종에 대한 항산화 효소, catalase, peroxidase, glutathione reductase 및 ascorbate peroxidase의 활성은 단백질당과 생체중당으로 환산했을 때 뚜렷한 차이를 보이지 않았다(Table 4-2). 이러한 결과로부터 ubiquitin promoter를 이용하여 *B. subtilis* Prottox 유전자를 발현시켜 형질을 전환한 낙동벼가 carfentrazone과 oxyfluorfen에 저항성을 나타내며 plastid에 *B. subtilis* Prottox 유전자를 발현시켜 형질을 전환한 벼가 세포질에 발현시켜 형질을 전환한 벼보다 *in vitro* 및 *in vivo* 상태에서 더 높고 균일한 저항성을 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

Table 4-2. Antioxidant enzyme activities of nontransgenic and the transgenic rice plants of the T3 generation. TC, transgenic control; C-22, transgenic line of cytoplasm targeted; P-32 transgenic line of plastid targeted.

Line	Enzyme activities (mg protein)			
	CAT	POD	APX	GR
Wild	2.56 ± 0.0039	2.77 ± 0.0402	0.80 ± 0.0024	0.13 ± 0.0036
TC	2.31 ± 0.0098	2.77 ± 0.0060	0.60 ± 0.0309	0.12 ± 0.0002
2022	2.25 ± 0.0165	2.36 ± 0.0146	0.60 ± 0.0548	0.13 ± 0.0004
2032	2.14 ± 0.0225	2.99 ± 0.0292	0.62 ± 0.0788	0.14 ± 0.0062
Enzyme activities (g fresh weight)				
Wild	2.16 ± 0.0091	2.34 ± 0.0157	0.67 ± 0.0516	0.12 ± 0.0009
TC	2.29 ± 0.0132	2.73 ± 0.0007	0.59 ± 0.0188	0.12 ± 0.0013
2022	2.29 ± 0.0048	2.40 ± 0.0156	0.62 ± 0.0188	0.14 ± 0.0078
2032	2.09 ± 0.0007	2.93 ± 0.0115	0.61 ± 0.0028	0.13 ± 0.0018

* Data indicates the average ± standard deviation. Specific activity of catalase: $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ decomposed/min/mg protein, peroxidase: $\mu\text{mol tetraguaicol}$ formed/min/mg protein, ascorbate: $\mu\text{mol ascorbate oxidized/min/mg protein}$, glutathione reductase: $\mu\text{mol NADPH oxidized/min/mg protein}$.

5. 형질전환 벼의 oxyfluorfen에 대한 저항성 기작

가. 재배종 벼의 경우

Oxyfluorfen을 비롯한 DPE계 제초제와 이와 구조적으로 관련된 여러 제초제들은 광상태하에서 식물체의 급격한 탈수와 탈색을 유기시킴으로써 제초 효과를 나타낸다. 이들 제초제는 porphyrin 합성 과정에서 Protogen이 산화되어 Protox으로 되는 과정에 관여하는 효소인 Protox의 활성을 저해하는 것으로 알려져 있다. 그러나 이들 제초제에 의해 이 효소의 활성이 저해되면 효소의 기질이 아니라 특이하게도 효소의 반응 산물이 급격히 축적된다. 즉 색소체의 외막에 있는 Protox가 제초제에 의해 저해되면 이 효소의 기질은 Protogen이 축적되지 못하고 색소체 바깥으로 이동된다. 또한 미토콘드리아는 Protox를 가지고 있지만 기질인 Protogen은 만들 수 없기 때문에 heme합성이 정상적으로 이루어지기 위해서는 제초제를 처리하지 않은 식물에서도 Protogen이 plastid로부터 미토콘드리아로 이동된다고 알려져 있다. Plastid로부터 이동한 Protogen은 원형질막에 존재하는 제초제 내성의 Protox 유사효소의 활성에 의해 Proto로 산화되는데 이 원형질막에 존재하는 제초제 내성의 Protox 유사효소의 활성에 의해 Proto로 산화되는데 이 원형질막의 Protox 유사효소는 peroxidase일 것으로 추측되고 있다(Lee *et al.*, 1993). 원형질막은 환원된 상태의 환경이 아니므로 이와 같은 산화 반응이 왕성하게 이루어지며 Proto는 친유성 분자로 원형질막에 계속적으로 축적된다. 이렇게 정상적인 porphyrin 합성 경로에서 이탈되어 원형질막에 축적된 Proto는 색소체나 미토콘드리아에서 Mg-Proto chelatase나 Fe-Proto chelatase에 의해 엽록소 및 heme으로의 합성에는 이용될 수 없게 된다. 원형질막에 축적된 Proto는 광활성 물질로 작용하여 광상태하에서 분자산소로부터 일중항 산소를 발생하여 지질과산화작용을 일으켜 세포막을 파괴하고 이러한 과정이 계속적으로 이루어지면 식물체가 죽게 된다(Fig. 4-37A).

나. Ubiquitin promoter의 조절을 받는 *B. subtilis* Protox 유전자를 세포질에 발현 시킨 경우

Oxyfluorfen에 의해 plastid의 Protox가 저해된 이후 plastid 바깥으로 이동한 Protogen은 원형질막으로 이동되어 Proto로 산화되기 전 세포질에 발현된

oxyfluorfen에 나타내는 *B. subtilis* Protox에 의해 세포질에서 Proto로 산화될 것이다. 그 이후 Proto는 친유성의 분자이므로 세포질로부터 plastid나 미토콘드리아로 이동할 것이며 Mg-Proto chelatase나 Fe-Proto chelatase의 작용으로 엽록소나 heme 합성에 사용될 것이다. 세포질에서의 Proto는 원형질 막으로도 이동될 것이나 chelatase 활성이 없는 원형질막에서의 Proto 축적은 형질을 전환하지 않은 재배종 벼의 경우에 비해 크게 감소될 것이다. 그러므로 oxyfluorfen에 의한 원형질막에서의 Proto 축적이 감소되기 때문에 저항성을 나타내는 것으로 풀이된다(Fig. 4-37B).

다. Ubiquitin promoter의 조절을 받는 *B. subtilis* Protox 유전자를 색소체에 발현 시킨 경우

색소체에서 발현되는 *B. subtilis* Protox는 oxyfluorfen에 내성을 나타내므로 oxyfluorfen을 처리한 경우에도 plastid에서 Protogen을 Proto로 산화시킬 수 있으며 oxyfluorfen을 처리하지 않은 재배종 벼의 경우에 비해 더욱 높은 Protox 활성을 나타낼 것이다. 그러므로 엽록소 또는 heme합성의 중간물질들이 plastid에 축적될 수 있을 것이며 Proto와 마찬가지로 광활성 물질로 작용할 것이다. 그러나 엽록소 또는 heme합성의 전구물질인 δ -aminolevulinic acid(ALA)의 합성이 축적된 heme이나 protochlorophyllide(PChlide)에 의해 feedback inhibition이 이루어질 것이므로 곧바로 광활성 물질의 축적이 증지될 것으로 생각된다. 따라서 이러한 경우에는 oxyfluorfen에 대해서는 저항성을 나타내면서 엽록소나 heme의 합성은 정상적으로 이루어질 것으로 예상된다(Fig. 4-37C).

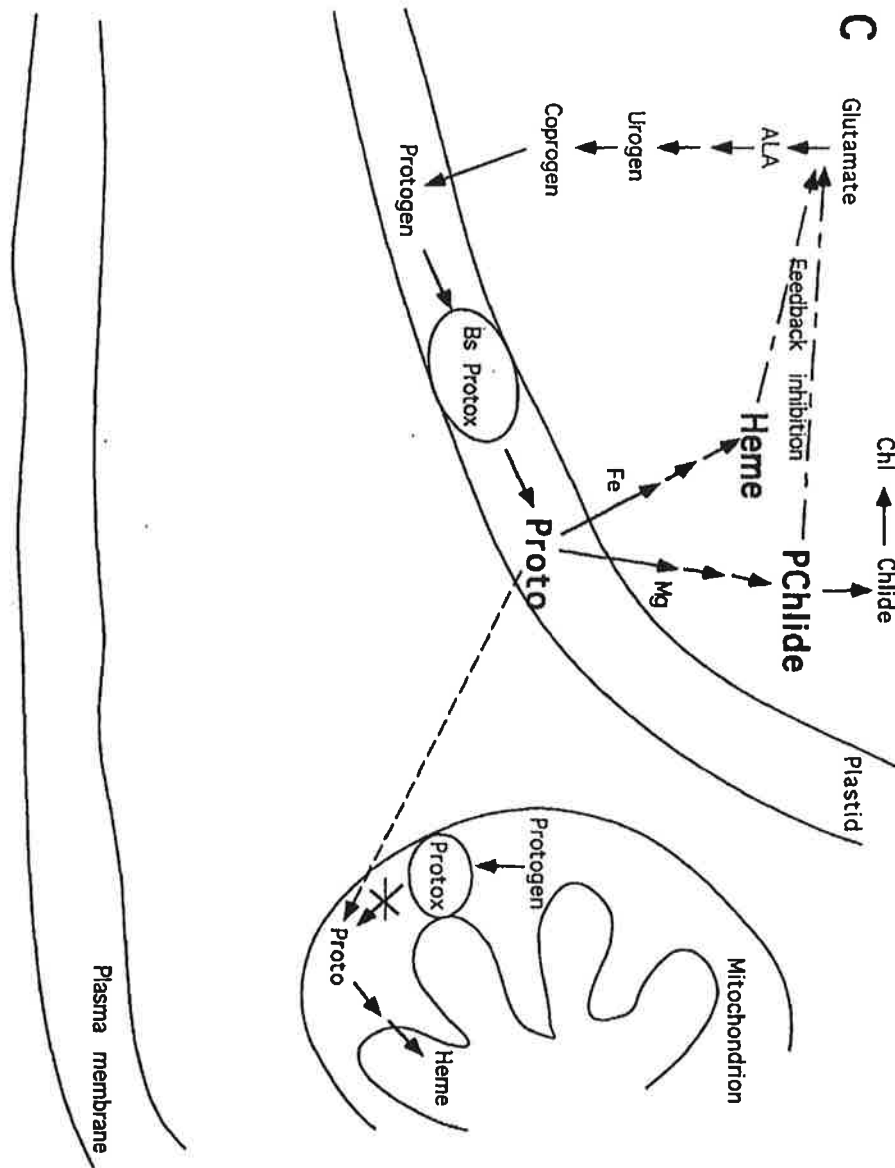


Fig. 4-37. Proposed mechanism of resistance to oxyfluorfen in transgenic plants. A, nontransgenic plants; B, transgenic plants having *B. subtilis* Protox in the cytosol; C, transgenic plants having *B. subtilis* Protox in the plastid.

제 4 절 결과요약

1. Oxyfluorfen에 대한 재배종 담배의 엽기별 반응

Diphenyl ether계 제초제인 oxyfluorfen에 의해 나타나는 세포내 구성물질의 누출, 엽록소 파괴, 지질과산화작용 등 전형적인 생리적 반응을 재배종 담배를 대상으로 하여 엽령별로 조사하였다. Oxyfluorfen을 담배의 엽절편에 처리하고 암조건에서 12시간 동안 배양한 후 광조건하에서 시간별로 전해물질의 누출을 측정된 결과, 암조건하에서는 전해물질의 누출은 일어나지 않았으나 광조건하에서 일정 기간의 lag period를 거친 후 배양시간이 경과함에 따라 크게 증가하였다. Oxyfluorfen에 의한 전해물질의 누출은 처리 농도의 증가에 따라 증대되었으며 담배 잎에 대한 oxyfluorfen의 효과는 엽령에 따라 크게 다르게 나타나 어린 잎일수록 전해물질의 누출이 뚜렷하였으며 반응의 lag period도 단축되었다. Oxyfluorfen에 의한 담배잎의 엽록소 함량 감소와 malondialdehyde의 생성도 엽령에 따라 크게 좌우되어 엽령별로 어린 잎일수록 크게 나타났다. 이상의 결과에서와 같이 oxyfluorfen에 의해 담배 잎에 나타나는 생리적 반응이 잎의 엽령에 따라 크게 달라져 담배는 diphenyl ether계 제초제에 대한 내성기작연구에 유용한 식물 재료가 될 것으로 생각된다.

2. Oxyfluorfen에 대한 야생형 담배와 형질전환 담배의 생리학적 반응 비교

Bacillus subtilis protoporphyrinogen oxidase 유전자를 *agrobacterium*을 매개체로 이용하여 전이시킨 후 cauliflower mosaic virus 35S promoter하에서 발현케 한 형질전환 담배를 유기하였다. 이러한 형질전환 담배의 diphenyl ether계 제초제 oxyfluorfen에 대한 생리적 반응과 여러 환경 조건하에서의 성장 반응을 재배종 담배와 비교하였다. Oxyfluorfen의 처리에 의해 나타나는 세포내 구성물질의 누출과 지질과산화작용은 재배종 담배에서보다 형질전환 담배에서 더 작게 이루어졌다. 형질전환 담배의 성장을 여러 온도, 광도 및 수분 조건에서 조사한 결과, 저광도와 포화수분 조건에서의 생장이 재배종 담배에 비해 다소 저하되는 현상이 나타났을 뿐 기타 조건에서의 생장은 재배종 담배의 성장과 거의 동일하였다. 따라서 *B. subtilis*

protoporphyrinogen oxidase 유전자를 전이시켜 cauliflower mosaic virus 35S promoter하에서 발현케 한 형질전환 담배는 oxyfluorfen에 대해 비교적 높은 저항성을 나타내지만 형질전환에 따른 성장 변화는 크게 일어나지 않음을 알 수 있었다.

3. Oxyfluorfen에 대한 밀의 내성 기작

밀과 보리의 내성 기작을 밝히고자 이들 성장반응, 전해물질의 누출 정도, 엽록소 함량 및 지질과산화작용의 산물인 MDA의 생성량, Protox의 활성 그리고 Proto IX의 축적량을 조사하였다. 경엽처리시의 oxyfluorfen의 I₅₀ 값은 토양처리시보다 월등하게 낮았으나 밀과 보리의 I₅₀ 값의 차이는 더욱 뚜렷하여 밀에 대한 I₅₀ 값이 보리에 대한 값보다 약 8배 높게 나타났다. Oxyfluorfen의 처리 농도에 따른 엽 절편으로부터의 시간별 전해물질의 누출은 밀보다 보리에서 뚜렷하게 이루어졌으며 엽록소의 파괴와 MDA의 생성도 보리보다 밀에서 더 작게 이루어졌다. 또한 oxyfluorfen의 처리농도에 따라 Proto IX이 밀과 보리의 잎에 축적되었는데 축적 정도가 밀에 비해 보리에서 더욱 뚜렷하였다. 그리고 oxyfluorfen 처리에 의해 보리 etioplast의 Protox 활성이 밀에 비해 크게 저해되었다. 그러므로 oxyfluorfen에 대한 밀과 보리의 감수성 차이는 이 제초제에 의한 Protox의 저해 차이에 기인하는 것으로 생각되며 이러한 사실이 밀이 이 제초제에 비교적 내성을 나타내는 이유로 설명되리라 추측된다.

4. Oxyfluorfen에 대한 형질전환 벼의 생리학적 반응

Diphenyl ether계 제초제에 내성을 나타내는 것으로 알려진 *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase(Protox) 유전자를 세포질 및 색소체에 전이시켜 형질을 전환한 벼(*Oryza sativa* L. cv. Nakdong)의 oxyfluorfen에 대한 생리적 반응을 비교하기 위하여 본 실험을 수행하였다. Hygromycin을 첨가한 2N6 배지에서 선발한 캘루스로부터 얻어진 *B. subtilis* Protox 유전자 전이 형질전환 개체를 Wagner pot에 이식하여 30/20℃의 성장상에서 1주일 동안 순화시킨 다음 30±5/20±5℃(주/야)의 온실조건에서 분얼기까지 성장시켰다. 형질전환 벼의 oxyfluorfen에 대한 생리적 반응을 형질을 전환하지 않은 벼와 비교하기 위해 엽절편 분석을 실시하였다. Oxyfluorfen에 의한 형질을 전환하지 않은 벼의 잎으로부터의 전해물질의 누출은

oxyfluorfen의 농도가 증가함에 따라 크게 증대되었다. 그러나 *B. subtilis* Protox 유전자 전이 형질전환 벼로부터의 전해물질의 누출은 재배종 벼에서보다 작게 이루어졌다. 특히 색소체에 *B. subtilis* Protox 유전자를 발현시켜 형질을 전환한 벼의 경우 oxyfluorfen에 의한 전해물질의 누출이 극히 미미하여 *B. subtilis* Protox 유전자를 세포질에 발현시킨 것보다 oxyfluorfen에 대한 더욱 뚜렷한 저항성을 나타내었다. 엽록소 함량의 감소는 oxyfluorfen의 농도가 증가함에 따라 크게 증대되었다. 그러나 *B. subtilis* Protox 유전자를 세포질에 발현시킨 경우나 색소체에 발현시킨 경우 모두 oxyfluorfen에 의한 엽록소 함량의 감소가 이루어지지 않았다. 지질과산화작용의 지표로 malondialdehyde(MDA) 생성량을 조사하였는데, oxyfluorfen에 의한 MDA의 생성량도 전해물질의 누출이나 엽록소의 경우에서와 마찬가지로 형질전환 벼에서 뚜렷하게 나타나지 않았으며 *B. subtilis* Protox 유전자를 세포질에 발현시킨 벼의 경우보다 색소체에 발현시킨 벼가 oxyfluorfen에 의한 MDA 생성이 더욱 작게 나타났다. Proto의 축적량은 무처리에서는 형질전환 벼와 형질을 전환하지 않은 벼사이에 거의 차이가 없었으나, carfentrazone과 oxyfluorfen을 처리한 경우에는 Proto IX의 축적이 높아졌다. 그러나 형질을 전환한 벼는 형질을 전환하지 않은 벼보다 Proto IX의 양이 적었고, 색소체에서 발현시킨 벼가 세포질에서 발현시킨 벼보다 Proto IX의 축적량이 다소 적었다. 또한 Protox 효소의 활성화는 무처리 상태에서는 형질전환벼가 형질을 전환하지 않은 벼보다 다소 활성이 높았으며, carfentrazone과 oxyfluorfen을 처리했을 경우에는 형질을 전환하지 않은 벼가 형질을 전환한 벼보다 활성 저해정도가 컸다. 따라서 *B. subtilis* Protox 유전자를 전이시켜 형질을 전환한 벼는 carfentrazone과 oxyfluorfen에 저항성을 나타내고 있음을 알 수 있었다. 이로써 *B. subtilis* Protox 유전자가 성공적으로 벼에 전이되어 형질이 발현되었음을 뒷받침할 수 있었다.

5. 형질전환 벼의 oxyfluorfen에 대한 저항성 기작

한편, oxyfluorfen에 대한 형질전환벼의 저항성 기작에 있어서 세포질에 발현시킨 형질전환 벼는 색소체에서 이탈한 protoporphyrinogen IX(Proto)은 oxyfluorfen에 내성을 나타내는 *B. subtilis* Protox에 의해 protoporphyrin IX(Proto)으로 산화되어

색소체와 미토콘드리아로 이동하여 porphyrin 생합성에 이용될 것이고 원형질막으로 이동되는 Protogen은 형질을 전환하지 않는 벼에 비해 그 양이 적을 것이므로 Proto의 감소에 의해 저항성을 나타낼 것으로 생각된다. 또한 색소체에서 발현시킨 형질전환 벼는 정상적으로 색소체에서 Protogen을 Proto로 산화시킬 수 있을 것이다. Oxyfluorfen을 처리하지 않은 경우에는 형질을 전환하지 않은 벼보다 그 Protox의 활성이 높을 것이므로 Proto가 과다하게 축적될 것이다. 그러나 porphyrin 생합성의 전구물질인 δ -aminolevulinic acid의 합성에 heme과 protochlorophyllide에 의한 feedback inhibition이 일어나 결국에는 과다한 Proto의 축적이 증지되어 정상적으로 porphyrin 생합성이 이루어지면서 저항성을 나타낼 것으로 생각된다.

제 5 절 참고문헌

- Becerril, J. M. and S. O. Duke. 1989. Protoporphyrin IX content correlates with activity of photobleaching herbicides. *Plant Physiol.* 90: 1175-1181.
- Becerril, J. M., M. V. Duke, U. B. Nandihalli, H. Matsumoto and S. O. Duke. 1992. Light control of porphyrin accumulation in acifluorfen-methyl-treated *Lemna paucicostata*. *Physiol. Plant.* 86: 6-16.
- Buege, J. A. and S. D. Aust. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52: 302-310.
- Camadro, J. M., M. Matringe, R. Scalla and P. Labbe. 1991. Kinetic studies on protoporphyrinogen oxidase inhibition by diphenyl ether herbicides. *Biochem. J.* 277: 17-21.
- Choi, G. J., H. J. Lee and K. Y. Cho. 1996. Lipid peroxidation and membrane disruption by vinclozolin in dicarboximide-susceptible and -resistant isolates of *Botrytis cinerea*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 55: 29-39.
- Choi, K. W., O. Han, H. J. Lee, Y. C. Yun, Y. H. Moon, M. Kim, Y. I. Kuk, S. U. Han and J. O. Guh. 1998. Generation of resistance to the diphenyl ether herbicide, oxyfluorfen, via expression of the *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase gene in transgenic tobacco plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 558-560.
- Dailey, T. A., P. Meisner and H. A. Dailey. 1994. Expression of a cloned protoporphyrinogen oxidase. *J. Biol. Chem.* 269: 813-815.
- Duke, S. O., H. J. Lee, M. V. Duke, K. N. Reddy, T. D. Sherman, J. M. Becerril, U. B. Nandihalli, H. Matsumoto, N. J. Jacobs and J. M. Jacobs. 1997. Mechanism of resistance to protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. In: R. De Prado, J. Jorrin and L. Garcia-Torres (eds.). *Weed and Crop Resistance to Herbicides*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 155-160.
- Duke, S. O., J. Lydon, J. M. Becerril, T. D. Sherman, L. P. Lehnen and H.

- Matsumoto, 1991. Protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. *Weed Sci.* 39: 465-473.
- Duke, S. O., U. B. Nandihalli, H. J. Lee and M. V. Duke. 1994. Protoporphyrinogen oxidase as the optimal herbicide site in the porphyrin pathway. *Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.* 559: 191-204.
- Hiscox, J. D. and G. F. Israelstam. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissues without maceration. *Can. J. Bot.* 57: 1332-1334.
- Jacobs J. M. and N. J. Jacobs. 1994. Factors affecting protoporphyrin accumulation in plants. *Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.* 559: 105-119.
- Jacobs J. M. and N. J. Jacobs. 1993. Porphyrin accumulation and export by isolated barley (*Hordeum vulgare* L.) plastids: Effect of diphenyl ether herbicides. *Plant Physiol.* 101: 1181-1187.
- Jacobs, J. M., N. J. Jacobs, S. F. Borotz and M. L. Guerinot. 1990. Effects of photobleaching herbicide, acifluorfen-methyl, on protoporphyrinogen oxidation in barley organelles, soybean root mitochondria, soybean root nodules, and bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* 280: 369-375.
- Jacobs, J. M., N. J. Jacobs, T. D. Sherman and S. O. Duke. 1991. Effect of diphenyl ether herbicides on oxidation of protoporphyrinogen to protoporphyrin in organelle and plasma membrane-enriched fractions of barley. *Plant Physiol.* 97: 197-203.
- Kenyon, W. H., S. O. Duke and K. C. Vaughn. 1985. Sequence of effects of acifluorfen on physiological and ultrastructural parameters in cucumber cotyledon disks. *Pestic. Biochem. Physiol.* 24: 240-250.
- Kömives, T. and G. Gullner. 1994. Mechanism of plant tolerance to photodynamic herbicides. *Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.* 559: 177-190.
- Lee, H. J. and S. O. Duke. 1994. Protoporphyrinogen-oxidizing activities involved in the mode of action of peroxidizing herbicides. *J. Agric. Food*

Chem. 42: 2610-2618.

- Lee, H. J., M. D. Ball, R. Parham and C. A. Rebeiz. 1992. Chloroplast biogenesis 65: Enzymic conversion of protoporphyrin IX to Mg-protoporphyrin IX in a subplastidic membrane fraction of cucumber etiochloroplasts. *Plant Physiol.* 99: 1134-1140.
- Lee, H. J., M. V. Duke and S. O. Duke. 1993. Cellular localization of protoporphyrinogen-oxidizing activities of etiolated barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves: Relationship to mechanism of action of protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. *Plant Physiol.* 102: 881-889.
- Lee, H. J., M. V. Duke, J. H. Birk, M. Yamamoto and S. O. Duke. 1995. Biochemical and physiological effects of benzheterocycles and related compounds. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2722-2727.
- Lydon, J. and S. O. Duke. 1988. Porphyrin synthesis is required for photobleaching activity of the *p*-nitrosubstituted diphenyl ether herbicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 31: 74-83.
- Matringe, M. and R. Scalla. 1988. Effects of acifluorfen-methyl on cucumber cotyledons: Protoporphyrin accumulation. *Pestic. Biochem. Physiol.* 32: 164-172.
- Matringe M., J. M. Camadro, M. A. Block, J. Joyard, R. Scalla, P. Labbe and R. Douce. 1992. Localization within chloroplasts of protoporphyrinogen oxidase, the target enzyme for diphenyl ether herbicides. *J. Biol. Chem.* 267: 4646-4651.
- Matringe, M., J. M. Camadro, P. Labbe and R. Scalla. 1989. Protoporphyrinogen oxidase as a molecular target of diphenyl ether herbicides. *Biochem. J.* 260: 231-235.
- Matsumoto, H. and S. O. Duke. 1990. Acifluorfen-methyl effects on porphyrin synthesis in *Lemna pausicostata* Hegelm. 6746. *J. Agric. Food Chem.* 38:

2066-2071.

- Matsumoto, H., J. J. Lee and K. Ishizuka, 1994. Variation in crop response to protoporphyrinogen oxidase inhibitors. Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. 559: 120-132.
- Nandihalli U. B., M. V. Duke and S. O. Duke. 1992a. Relationships between molecular properties and biological activities of *o*-phenyl pyrrolidino- and piperidino-carbamate herbicides. J. Agric. Food Chem. 44: 1993-2000.
- Nandihalli, U. B., M. V. Duke and S. O. Duke. 1992b. Quantitative structure-activity relationships of protoporphyrinogen oxidase-inhibiting diphenyl ether herbicides. Pestic. Biochem. Physiol. 43: 193-211.
- Reddy K. N., H. J. Lee, U. B. Nandihalli, M. V. Duke and S. O. Duke. 1995. Predicting activity of protoporphyrinogen oxidase inhibitors by computer-aided molecular modeling. Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. 589: 211-224.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Scalla, R. and M. Matringe. 1994. Inhibitors of protoporphyrinogen oxidase as herbicides: Diphenyl ethers and related photobleaching molecules. Rev. Weed Sci. 6: 103-132.

제 5 장 형질전환 식물의 환경 반응 특이성, 생산성 비교 연구

제 1 절 서 설

형질전환식물의 일반적인 환경특이성은 특정기능을 구비하는 대신에 에너지 전환 이용상의 균형파괴에 따른 특정 환경 적응 및 이용 효율에 차질을 일으키는 반응을 보이는 점에 있으며 이를 생물적 대가(biological cost)라 한다. 특히 생장 및 등숙의 기본 요소인 온도·광·수분 및 CO₂에 대한 반응 특이성을 들 수 있다. 더욱이 새로운 형질전환 식물을 창출하기 위한 연구에서 중요한 사항은 도입된 유전자가 식물체에서 전사·전이되어야 하며 생합성된 단백질이 안정된 상태로 유전되고 발현되어야 한다. 그러기 위해서는 외래 유전자 단백질 생산성을 기준으로 한 선발과 더불어 이들을 교배한 후대에서 안정된 상태로 도입된 유전자의 유전과 발현 여부에 대한 검토가 필수적이다. 따라서 본 연구는 형질전환 식물체와 비형질전환 식물체간 교배를 하여 이들의 T₂, T₃ 및 BC₁F₁ 세대에서 도입된 유전자를 표지인자로 유전분리현상을 조사하여 형질전환 식물체의 후대 유전적 안정성과 이들 형질전환 식물체의 환경 반응 특이성을 검토하고 아울러 형질전환 식물체로부터 수확한 쌀과 재배종 쌀간의 미질 안정성을 검토하고자 하였다.

제 2 절 연구 수행 방법

1. 형질전환 담배의 온도, 광 및 수분 반응

형질전환 담배의 환경 반응 특이성을 조사하기 위하여 *B. subtilis*의 Protox 유전자를 전이시켜 형질이 전환된 담배 종자를 70% 에탄올에 30초간 처리한 후 50% 상업용 표백제에 10분간 침적하여 표면 살균하고 멸균증류수로 3회 세척하여 100 mg/ℓ의 kanamycine이 첨가된 MS (Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에 치상하였다. 그러

나 비형질 전환된 담배 종자는 kanamycine이 첨가되지 않은 MS배지에 치상하였다. 성장상에서 1개월 동안 생육시켜 본엽 2엽(초장 1.5cm)이 된 담배를 실험에 사용하였다. 이들 식물체는 질석과 원예육묘용 상토를 1:1비율로 희석하여 충진한 pot에 파종하여 1주일간 환경조절이 용이한 성장상에서 순화시킨 후 다양한 환경반응에 공시하였다. 온도 반응은 담배의 생육 적온인 25℃, 고온 35℃와 저온 한계온도인 15℃로 처리하였고(온도 반응시 광량은 $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 이고, 토양 수분은 70%), 광량은 20, 100 및 $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 수준으로 처리하였다. 이때의 온도는 25℃, 토양 수분은 70%로 조절하였다. 수분은 토양수분을 100%와 식물 생육에 적합한 70% 두 수준으로 처리하였다(이때 온도는 25℃이고 광량은 $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). 그리고 이들 식물체를 성장상보다 환경변이폭이 큰 온실 환경 조건(온도 : 저온 17~20℃, 고온 28~35℃)에 공시하였다.

이들 성장상 및 온실 조건의 환경에 처리 후 8, 20, 27, 34 및 40일에 초장, 엽수, 최장의 엽폭 및 생체중을 조사하였다.

2. 형질전환 벼의 환경 반응 특이성, 생산성 비교

가. 비료(N-P-K) 시용량에 따른 형질전환 벼의 생육 반응

형질을 전환하지 않은 벼(nontransgenic rice, NT)와 형질전환벼(transgenic control, TC; transgenic rice targeted to cytosol, C; transgenic rice targeted to plastid, P)의 4계통을 대상으로 농촌진흥청에서 일반 농가에 추천하는 시비량, 즉 N-P-K=11-4.5-5.7kg/10a를 기준으로 각각 무비, 1/2시비, 추천량, 2배 시비 수준으로 설정하고 Wagner Pot(1/5000a)에 고르게 마쇄한 는 토양을 충진한 후 C, P 및 TC 계통은 hygromycin 배지에서 선발한 식물체를 이앙하였고, NT는 증류수에서 발아시킨 후 이앙하였다. 벼 생육에 적정 조건을 부여하기 위하여 온실내 온도 조건은 주간 $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 야간 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지하였고 일장은 주간 14시간, 야간 10시간으로 유지하였으며 이앙 후 10주째(이앙 후 65일)부터는 개화 출수를 촉진시키기 위하여 주간 8시간, 야간 16시간의 단일 조건을 유지하기 위하여 암막을 이용한 단일처리를 실시하였다. 생육 조사는 이앙 후 7일 간격으로 식물체의 초장, 분얼경수, 엽수를 조사하

여 계통간 생육 차이를 비교하였다.

나. 수분 조건 및 상처에 의한 형질전환 벼의 내성 반응

위의 실험 "가"와 동일한 방법으로 4계통을 포트에 이양한 후 담수 조건(관행재배)과 건답 조건으로 유지하였고 상처는 이양 후 7일에 지표면으로부터 3cm 부위에서 인위적으로 90도로 절간하였다. 기타 재배 방법과 조사 내용은 상기 "가"의 시험과 동일하게 수행하였다.

다. 농약의 종류에 의한 형질전환 벼의 내성 반응

농가에서 가장 많이 사용하고 있는 살충제, 살균제, 제초제 사용에 따른 형질전환벼의 내성여부 및 생육의 차이를 비교하기 위해 형질전환벼(C4, P4, TC, Wild type) 4계통을 대상으로 살충제는 멸구류를 적용대상으로 하는 카바메이트계 BPMC(상품명: 밧사) 50%와 나방류를 적용대상으로 하는 Cartap hydrochloride(상품명: 파단) 50%를 각각 200 ml, 200 g/10a를 이양 후 15일과 30일에 경엽처리 하였다. 살균제는 잎집무늬마름병 적용 항생제로서 Validamycin A (상품명: 바리문) 5%와 도열병 방제약제인 Carpropamid (상품명: 솔라자) 15%를 각각 320 ml, 156 ml/10a 약량으로 이양 후 15일과 30일에 경엽처리하였다. 제초제는 Pyrazosulfuron + molinate 합제(상품명: 노난매)를 표준량의 배량으로 이양 후 15일에 수면 처리하였다. 기타 재배방법과 조사내용은 상기 "가"와 동일하게 수행하였다.

라. 제초제와 질소의 상호작용 효과(포트시험)

형질을 전환하지 않은 벼와 각각 세포질과 색소체에 targeting하여 형질전환 벼 2계통을 대상으로 Protox 저해형 제초제 carfentrazone 0 및 50 g ai/ha와 농촌진흥청에서 일반 농가에 추천하는 표준 시비량(N-P-K=11-4.5-5.7kg/10a)과 추천량의 2배로 처리하여 이들 상호작용에 의한 벼의 생육과 수량구성 요소의 차이를 비교하였다. 이들 실험을 위하여 형질전환 벼와 재배벼의 종자를 침종하고 최아시켜 Wagner Pot(1/5000a)에 파종하였다. 시험구 배치는 분할구 배치법으로 하였다. 질소질 비료는 50%를 기비로 사용하고 분얼비 30%, 수비 20%로 각각 분시하였다. 인산과 칼리질 비료는 전량기비로 사용하였다. 이들 비료는 파종 전 2일에 토양 혼화처리 하였고,

carfentrazone는 파종 후 5일에 처리하였다. 제초제 약해는 처리 후 1주일 간격으로 5주까지 초장 및 분얼수를 조사하여 알아보았다. 수량성은 수확기에 수량구성 요소를 조사하여 알아보았다.

마. 재배환경(재식밀도 x 질소) 변화에 따른 생장 및 수량성(포장시험)

위의 실험 “가”와 같이 세포질과 색소체에 targeting하여 형질전환벼 각각 2계통과 재배벼를 재식밀도 3수준(소식 30 x 19 cm, 표준 30 x 15 cm, 밀식 30 x 12 cm)과 질소처리를 2수준(표준량 및 배량, 실험 “나”와 동일)으로 달리하여 벼의 생장 반응을 조사하였다. 이들 종자를 침종하고 최아시켜 10일간 육묘한 후 는 포장에 이양하였다. 이양은 5월 19일에 하였고, 이양 후 30일과 50일에 분얼수를 조사하였고, 수확기에 수량구성 요소를 조사하여 실제포장에서 형질전환 벼의 생산성을 비교하였다.

바. 이양시기별 형질전환벼의 생육 반응

B. subtilis Protox 유전자를 세포질과 색소체에 발현하도록한 형질전환벼 각각 2계통과 재배벼를 침종하고 최아시켜 10일간 육묘한 후 는 포장에 표준 재식밀도(15 x 30 cm)로 1본씩 각각 4단계로 나누어 이양하였다. 이양은 5월 19일, 5월 28일, 6월 5일에 하였고, 그 밖의 시비 및 농약 살포 등의 재배는 농촌진흥청 표준재배법에 준하여 관리하였다. 이양 후 4주와 8주에 초장 및 분얼수를 조사하여 재배벼와 형질전환 벼의 생육 반응을 비교하였다.

사. 형질전환 식물의 유전적 안정성 평가

형질전환된 식물체의 후대 유전적 안정성을 검토하기 위하여 형질 전환된 식물체를 교배하여 얻은 후대에서 도입 유전자의 발현정도를 토대로 유전분석을 실시하였다.

1) 교배 및 후대 육성

제초제 저항성 유전자를 형질전환시킨 개체와 비형질 전환 개체간 약 10여 조합을 작성하고 온실에서 교배하고 일부는 비형질 전환개체와 여교잡 하였으며 형질전환식

물체를 1~2번 자식시킨 T_2 , T_3 종자와 여교잡시킨 BC_1F_1 종자를 유전분리비와 도입된 저항성유전자의 copy 수를 확인하는 재료로 이용하였다. 교배 모본들의 개화기는 일장처리에 의해 조절하여 교배모본간 수분시기를 맞추고 교배는 교배 하루 전 절영법으로 제웅하여 봉지를 씌어 두었다 다음날 실시하였다.

2) 후대 안정성 검정

T_1 및 T_2 세대에서 형질전환 유무 확인법에 의해 모본의 copy 수의 동일성 여부를 조사하여 도입된 유전자의 발현 정도가 강한 계통을 분리하여 보존하였다. 도입된 유전자의 발현 여부를 Genomic DNA를 분리한 Southern blot분석과 mRNA를 분리한 Northern blot분석법에 의해 식물체내에 도입된 제초제 저항성 유전자의 보존 및 발현 여부를 확인하였다.

아. 미질 안정성

미질 안정성은 형질전환 계통 2005, 2017, 2032, 2040, 2057, 2072, 2089, 2093, 2094와 재배종인 벼(2075)를 도정하여 아래와 같은 특성을 조사하여 알아보았다.

1) 쌀알의 일반 특성

쌀알의 크기는 쌀의 장반경과 단반경을 Caliper를 이용하여 측정하였고 두 길이의 비율을 비교하였으며, 천립중은 일정량의 쌀알 무게를 측정한 후 1000개의 쌀알 무게로써 표시하였다. 쌀의 수분흡수력은 1g의 쌀을 그물구조의 망에 넣고 30℃와 4℃에서 일정시간 수분을 흡수하도록 한 다음 쌀알 표면의 수분을 제거하고 무게를 측정하여 쌀에 흡수된 수분함량을 계산하였다(한승희 등, 2000). 쌀알의 색도 비교는 Color Chroma meter(Minolta, Japan)를 이용하여 쌀알의 색도를 비교하였다. 쌀알의 알칼리 붕괴도는 10 mL 비이커에 2N NaOH 3 mL을 넣고 쌀알 하나를 넣어 쌀알이 완전히 붕괴되는 시간을 비교하였다.

2) 쌀가루의 제조

멥쌀 시료를 food mixer로 분쇄하여 45메쉬 체를 통과시킨 다음 쌀가루 시료로 사

용하였고, 냉동실에 보관하면서 사용하였다. 쌀가루의 일반성분인 수분, 단백질, 총 지방질과 조 지방질, 회분함량은 AOAC 방법(1990)에 준하여 분석하였다.

3) 쌀가루의 특성

① 아밀로오스 함량

Williams 등(1970)의 방법에 의해 다음과 같이 분석하였다. 쌀가루 20 mg(건량 기준)에 0.5N KOH를 10 mL 첨가하여 막대자석을 넣고 저어주면서 호화시킨 후, 그 중 10 mL를 50 mL 용량플라스크에 취하였다. 0.1N HCl 5 mL를 가하고 중화시킨 후 요오드 용액 0.5 mL를 가하여 정용한 다음 실온에서 5분간 방치하여 분광광도계로 680 nm에서 흡광도를 측정하였다. Montgomery와 Senti 방법(1958)으로 쌀 전분에서 아밀로오스와 아밀로펙틴을 분리하여 아밀로오스 표준곡선을 구하였고 이로부터 아밀로오스 함량을 계산하였다.

② 물결합능력

Medcalf와 Gilles 방법(1965)에 의해 다음과 같이 측정하였다. 쌀가루 1g에 증류수 40 mL를 가하여 1시간 동안 교반한 다음 원심관에 넣고 3000 rpm에서 30분간 원심 분리 하였다. 1분간 거꾸로 세워 상징액을 제거하고 침전된 무게를 측정하여 시료 쌀가루와의 중량비로부터 계산하였다.

$$\text{물결합능력(\%)} = \frac{\text{침전된 쌀가루 무게(g)} - \text{처음 쌀가루의 무게(g)}}{\text{처음 쌀가루의 무게}} \times 100$$

③ 팽윤력과 용해도

Schoch 방법(1964)에 의해 65℃에서 95℃까지 일정온도 간격으로 가열하여 다음과 같이 측정하였다. 전분 0.5 g(건량 기준)을 증류수 40 mL에 잘 분산시킨 다음 각 온도에서 교반기로 30분간 저어주고 3000 rpm, 4℃ 조건에서 30분간 원심분리 하여 침전된 무게로부터 아래 식에 의해 팽윤력을 계산하였다.

$$\text{팽윤력} = \frac{\text{침전된 쌀가루 무게}}{\text{시료의 무게(건량 기준)} \times (100 - \% \text{용해도})} \times 100$$

용해도는 미리 준비해 둔 페트리디쉬에 원심분리한 후의 상정액을 부어 오븐에서 건조시킨 후 무게의 차이로써 계산하였다.

$$\text{용해도}(\%) = \frac{\text{건조후 남은 잔사의 무게(g)}}{\text{쌀가루의 무게(g)}} \times 100$$

④ 총 전분함량

총 전분함량은 AACC 방법(1983)에 따라 Megazyme kit (K-TSTA, Megazyme International Ireland Limited, Ireland)를 사용하여 측정하였다. 시료 100 mg(건량 기준)에 80% 에탄올 0.2 mL을 넣고 분산시킨 후 α -amylase와 amyloglucosidase를 차례로 반응시켰다. 반응 후 100 mL로 정용시킨 다음 이 중 10 mL를 취하여 3000 rpm에서 10분간 원심분리하고 이 중 0.1 mL를 취한 후 GOPOD 용액을 가하여 반응시키고 분광광도계로 510 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식으로부터 총 전분함량을 계산하였다.

$$\text{전분함량} = \Delta E \times F \times 1000 \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180}$$

ΔE = 시료의 흡광도 - blank의 흡광도

$$F = \frac{100 (\mu\text{g})}{\text{glucose 100 g에 대한 흡광도}}$$

W = 가루 무게 (μg)

⑤ 손상전분 함량

손상전분함량은 AACC(1983) 방법에 따라 측정하였다. 시료 0.2 g(14% 수분함량)을 넣은 시험관에 효소액(α -amylase)을 혼합한 다음 30℃ 항온수조에서 15분간 반응시킨 후 3.68 N 황산용액 0.6 mL와 sodium tungstate 용액 0.4 mL을 가하여 2분간 정지하여 여과지로 여과하였다. 여과액 5 mL에 0.1 N alkaline ferricyanide 용액 10 mL를 가하여 끓는 항온수조에서 20분간 반응시킨 후 acetic acid-salt 용액 25 mL, soluble starch-KI용액 1 mL를 첨가하여 잘 혼합하였다. 이를 0.1 N thiosulfate 용액으로 적정하고 적정시 소요된 0.1 N thiosulfate양은 AACC 22-18에 의해 시료 10 g 당 maltose양으로 전환시킨 다음 아래 식을 이용하여 전분의 손상도를 계산하였다.

$$\text{전분의 손상도(\%)} = 0.082 \times \text{mg maltose}/10 \text{ g sample}$$

⑥ 호화특성 측정

a. 신속점도측정계에 의한 호화 양상

쌀가루의 가열에 의한 점도변화로 측정하는 호화특성은 Rapid Visco Analyser(RVA)를 이용하여 시료 4 g (14% 수분함량)을 증류수 25 mL에 분산시키고 0-2분은 가열온도 50℃에서, 2-8분은 95℃까지 상승, 8-12분은 95℃에서 유지, 12-18분은 다시 50℃로 냉각, 18-22분은 50℃를 유지하면서 점도의 변화를 측정하여 비교하였다.

b. 시차주사열량기에 의한 호화

물과 쌀가루의 비가 3:1이 되게 하여 알루미늄 팬에 밀봉한 다음 12시간 방치하여 30-120℃까지 5℃/분의 속도로 가열하면서 호화 특성을 측정하였다.

4) 전분의 특성 비교

① 전분의 분리

약 100 g의 시료를 두 배 정도의 증류수에 침지하여 불린 후 믹서로 마쇄하였고 마쇄한 쌀가루 현탁액을 100 메쉬와 270 메쉬체에 차례로 통과시키는 과정을 통해 전

분을 분리하였다.

② 전분의 일반성분 분석

수분, 단백질, 총 지방질과 조 지방질, 회분함량은 AOAC 방법²⁾에 준하여 분석하였다.

③ 전분의 이화학적 특성

a. 아밀로오스 함량

Williams 등의 방법³⁾에 따라 분석하였는데 쌀전분 20 mg(건량 기준)에 0.5N KOH를 10mL 첨가하여 막대자석을 넣고 저어주면서 호화시킨 후, 그 중 10 mL를 50 mL 용량 플라스크에 취하고 0.1N HCl 5 mL를 가하여 중화시킨 후 요오드 용액 0.5 mL를 가하여 정용한 다음 실온에서 5분간 방치하여 분광광도계로 680 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아밀로오스 표준곡선으로부터 아밀로오스 함량을 계산하였다.

b. 물결합능력

Medcalf와 Gilles 방법(1965)에 의해 다음과 같이 측정하였다. 쌀 전분 1g에 증류수 40 mL를 가하여 1시간 동안 교반한 다음 원심관에 넣고 3000 rpm에서 30분간 원심분리 하였다. 1분간 거꾸로 세워 상징액을 제거하고 침전된 무게를 측정하여 시료와의 중량비로부터 계산하였다.

$$\text{물결합능력(\%)} = \frac{\text{침전된 전분의 무게(g)} - \text{처음 전분의 무게(g)}}{\text{처음 전분의 무게}} \times 100$$

c. 팽윤력과 용해도

Schoch 방법(1964)에 의해 65℃에서 95℃까지 일정온도 간격으로 가열하여 다음과 같이 측정하였다. 전분 0.5 g(건량 기준)을 40 mL에 잘 분산시킨 다음 각 온도에서 교반기로 30분간 저어주고 3000 rpm, 4℃ 조건에서 30분간 원심분리하고 침전된 무게로부터 아래 식에 의해 팽윤력을 계산하였다.

$$\text{팽윤력} = \frac{\text{침전된 전분 무게}}{\text{시료의 무게(건량 기준)} \times (100 - \%용해도)} \times 100$$

용해도는 미리 항량해 둔 페트리디쉬에 원심분리한 후의 상정액을 부어 오븐에서 건조시킨 후 무게의 차이로 계산하였다.

$$\text{용해도}(\%) = \frac{\text{건조후 남은 전분의 무게(g)}}{\text{전분의 무게(mg)}} \times 100$$

d. 호화특성

쌀 전분의 가열에 의한 점도변화로 측정하는 호화특성은 Rapid Visco Analyser(RVA)를 이용하여 시료 3 g(14% 수분함량)을 증류수 25 mL에 분산시키고 0-2분은 가열온도 50℃에서, 2-8분은 95℃까지 상승, 8-12분은 95℃에서 유지, 12-18분은 다시 50℃로 냉각, 18-22분은 50℃를 유지하면서 점도의 변화를 측정하여 비교하였다.

5) 취반미의 특성

① 밥의 수분함량 측정

각각의 쌀을 3번 반복하여 씻어준 후, 쌀과 물의 비율을 1: 5로 하여 최대 흡수력을 보이는 40분간 실온에서 방치한 다음 전기밥솥으로 30분간 취반하였다. 취반 후 뚜껑을 열고 김을 뺀 다음 실온에서 냉각하고 105℃에서 상압가열건조법으로 밥의 수분함량을 측정하였다.

② 기계적 방법에 의한 밥의 텍스처 측정

쌀과 물의 비율을 1: 4로 하여 40분간 실온에서 침지시킨 후 30분간 전기밥솥(금성, 한국)으로 밥을 지었다. 밥알 세알을 이용하여 Rheometer로 second bite compression test를 실시하였으며, load cell은 1 kg, probe는 직경 2cm인 실린더형,

deformation은 70%로 조정하여 측정하였다. TPA로부터 텍스처 측정치를 계산하였다.

③ 관능평가에 의한 차이식별 검사 및 기호조사

7명의 평가원을 선정하여 실험목적을 설명하고 그림 1에 제시한 sheet를 이용하여 쌀밥의 외관, 냄새, 맛, 텍스처 특성, 전체적인 기호도의 순서로 각각에 대해 잘 인지하도록 훈련시킨 후 각 평가원이 각각의 시료마다 sheet의 내용대로 평가하도록 하였다. 각각의 검사를 통해 얻은 자료는 SAS로 통계처리 하여 분석하였다.

쌀밥의 관능검사

이름 _____ 날짜 _____ Code _____

다음은 쌀밥에 대한 각 특성을 알아보기 위한 것입니다.
 1 단계는 밥을 씹기 전 단계로 밥의 냄새와 외관을 평가하는 단계이며, 2 단계는 밥을 반복하여 씹은 후 입에서의 밥의 텍스처를 측정하는 단계입니다. 마지막으로 3 단계에서는 전체적으로 밥의 바람직한 정도를 측정하는 단계입니다.

1. 1 단계

구수한 냄새(Roasted nutty taste)	적다	보통이다	많다
색깔(Color)	누렇다	보통이다	희다
윤기(Glossiness)	적다	보통이다	많다
밥알의 온전도	깨졌다	보통이다	온전하다
덩어리짐(Clumpiness)	흩어져있다	보통이다	뭉쳐있다

2. 2단계

단맛(Sweet taste)	적다	보통이다	많다
구수한 맛(Roasted nutty taste)	적다	보통이다	많다
찰기(Stickiness)	약하다	보통이다	강하다
경도(Hardness)	약하다	보통이다	강하다
응집성(Cohesiveness)	적다	보통이다	많다
부착성(Adhesiveness)	약하다	보통이다	강하다
진정도((Moistness)	적다	보통이다	많다

3. 3단계

전체적인 선호도 (Overall eating quality)	나쁘다	보통이다	좋다
--------------------------------------	-----	------	----

Fig. 5-1. Sensory evaluation sheet for cooked rice

제 3 절 연구 결과 및 고찰

1. 형질전환 담배의 환경 반응 특이성

가. 형질전환 담배의 온도 반응

형질전환된 담배와 비형질 전환된 담배 식물체를 온도 조절이 용이한 성장상에 생육하여 담배의 생육, 적온인 25℃, 저온 및 고온 한계온도인 15℃와 35℃로 각각 처리하여 이들 온도에 대한 반응 차이를 알아보았다(Fig. 5-2). 초장, 엽수 및 생체중은 이들 온도에 대하여 형질전환된 담배와 비형질전환된 담배간에 생육차이는 없었다. 최장의 엽폭에서는 25℃와 35℃ 처리에서는 차이가 없었으나, 15℃처리에서는 형질전환된 담배 식물체가 비형질전환된 담배 식물체보다 엽폭이 적은 경향을 보였다.

나. 형질전환된 담배의 광량 반응

형질전환된 담배와 비형질전환된 담배 식물체에 대한 광량의 반응을 초장, 엽수, 엽폭 및 생체중 차이로 알아보았다(Fig. 5-3). 광량에 대한 반응도 온도 반응과 유사한 경향 즉, 형질전환된 담배와 비형질전환된 담배식물체간에 차이가 없었으나 낮은 광량인 $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 에서의 초장, 엽폭 및 생체중은 비형질전환된 담배보다 형질전환된 담배에서 적은 경향을 보였다.

다. 형질전환 담배의 수분 반응

토양 수분은 100%와 70%로 처리하여 형질전환된 담배와 비형질전환된 담배 식물체에 대한 반응을 초장, 엽수, 엽폭 및 생체중으로 알아보았다(Fig. 5-4). 토양 수분을 100%로 유지하여 생육한 담배 식물체는 초장과 생체중에서 비형질전환된 담배보다 형질전환된 식물체에서 생육이 떨어지는 경향을 보였다. 그러나 그 밖의 엽수와 엽폭에서 차이를 보이지 않았다.

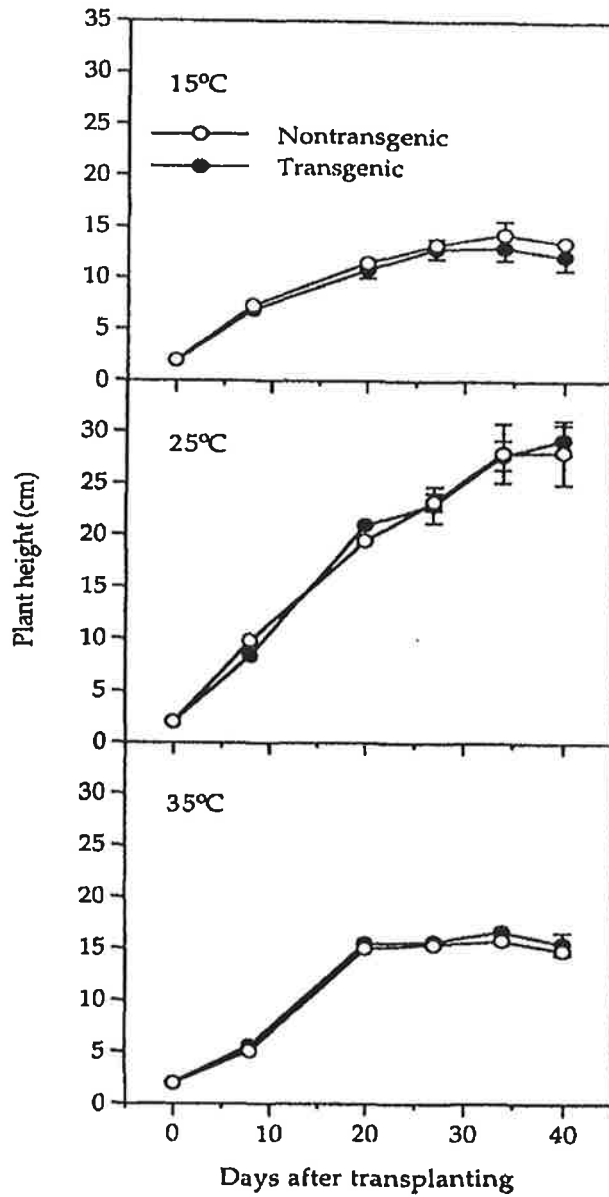


Fig. 5-2. Growth of the nontransgenic and the transgenic tobacco plants under various temperature conditions.

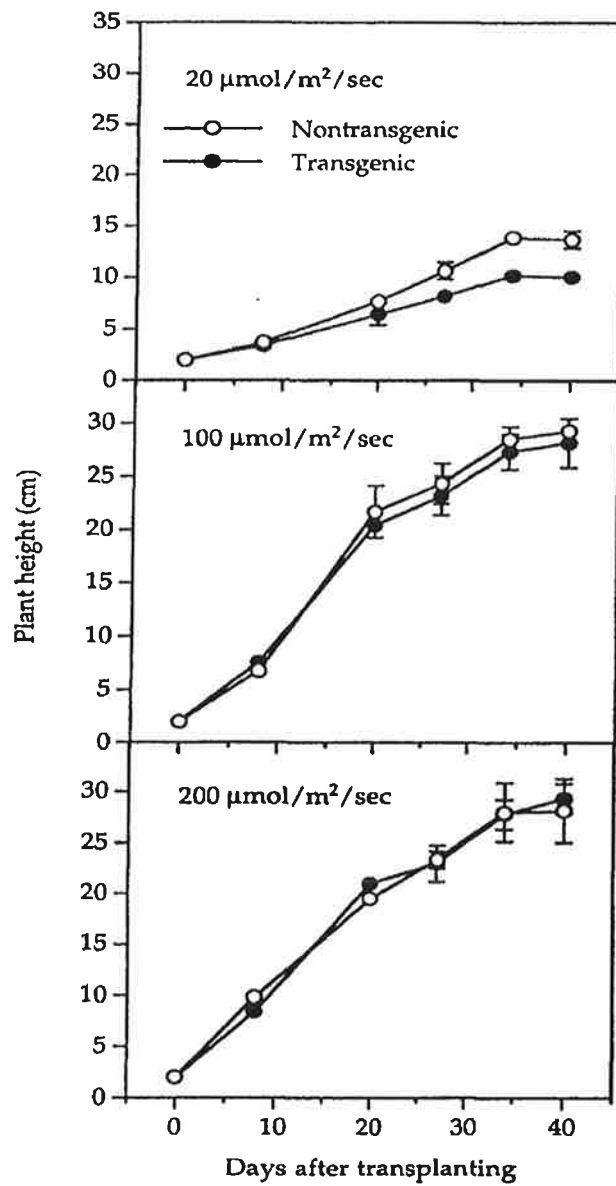


Fig. 5-3. Growth of the nontransgenic and the transgenic tobacco under various light conditions.

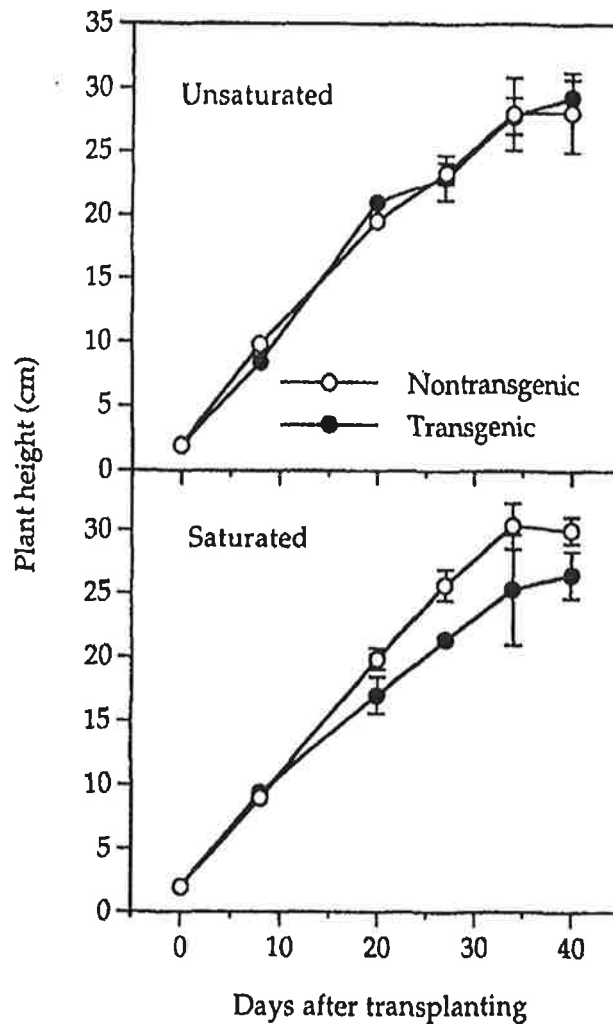


Fig. 5-4. Growth of the nontransgenic and the transgenic tobacco under unsaturated and saturated water conditions.

라. 형질전환 담배의 온실 조건 반응

생장상의 환경 반응보다 반응 차이가 큰 온실 조건에서 이를 식물체간의 반응 차이를 알아보았다. 초장과 엽수는 비형질전환 담배보다 형질전환 담배에서 생육이 떨어진 경향을 보였으나 그 차이는 크게 인정되지 않았다. 그러나 엽폭과 생체중은 형질전환 담배에서 생육이 떨어진 경향을 보였다. 따라서 이들의 결과를 토대로 볼 때 생

장상의 특정 환경보다 환경 변이의 폭이 큰 온실 조건에서 이들 식물체간에 차이가 컸던 경향을 보였다. 이들 환경에 대한 일부 특정 저온, 저광 및 과수분 상태에서 형질전환된 담배 식물체에서 생육이 떨어진 경향을 보였으나 그 차이가 크지 않았던 것으로 보아 형질전환시 예상된 에너지 전환이용상의 균형 파괴에 따른 생육저해는 적을 것으로 예상되었다.

2. 형질전환 벼의 환경 반응 특이성, 생산성, 유전성 비교

가. 비료(N-P-K)시용량에 따른 형질전환 벼의 생육 반응

시비량 차이에 의한 형질전환벼의 생육 차이를 규명하기 위하여 현재 농촌진흥청에서 추천한 단위면적(10a)당 N:P:K=11:4.5:5.7kg을 표준시비량으로 하고 표준시비량의 0, 1/2, 1, 2배량 수준으로 시비량을 조절한 후 낙동벼의 wild type, transgenic control, C line과 P line의 벼를 각각 1본씩 포트에 이앙하고 이앙 후 1주 간격으로 벼의 초장, 분얼수, 엽수의 변화를 시기별로 조사하였다. 일반적으로 시비량이 증가할수록 벼의 초장, 분얼수 및 엽수가 증가하는 경향을 나타내었다. 특히 생장요인들 중 시비량의 증가에 따른 변화가 가장 민감하게 나타난 형질은 분얼이었다. 표준시비량보다 더 높은 시비량에서 형질전환 벼가 비형질전환 벼보다 분얼 개시시기가 빨라졌고 분얼수도 증가되었으며 이에 반하여 무비구와 반비구에서의 형질전환 벼는 비형질전환 벼보다 분얼수가 더 작았다. 형질전환 대조벼와 비교하였을 경우에도 이러한 경향은 *B. subtilis* Protox 유전자를 세포질이나 색소체에 발현시켜 형질을 전환한 벼에서 더욱 뚜렷하였다. 또한 색소체에 *B. subtilis* Protox 유전자를 발현시켜 형질을 전환한 벼의 생육은 세포질에 *B. subtilis* Protox 유전자를 발현시켜 형질을 전환한 벼의 생육보다 시비량에 의하여 더 영향을 받는 것으로 나타났다. 어느 시비량에서도 형질전환 대조 벼의 생장이 형질을 전환하지 않은 벼보다 더 열등한 경향이 있었다. 시비량 증가에 따른 엽수의 증가는 분얼수의 증가에서와 유사하였으나, 초장의 증가는 뚜렷하지 않았다. 이러한 결과로부터 형질전환 벼는 형질을 전환하지 않은 벼에 비해 다소 많은 시비량을 필요로 하는 사실을 알 수 있었으며 형질전환 벼의 생육은 표준시비량보다 낮은 조건에서 지연됨을 관찰하였다(Tables 5-1, 2, 3).

Table 5-1. Comparison to plant height (cm) of the nontransgenic and transgenic rice (cv. Nakdong) to various fertilization rates at different growth stages. WAT, weeks after transplanting; NT, nontransgenic lines; TC, transgenic control; C, cytosol targeted transgenic lines; P, plastid targeted transgenic lines.

WAT	NT	TC	C	P
No fertilization				
1	24.5	19.0	23.3	22.0
2	30.5	23.8	32.7	31.2
3	38.8	33.0	38.3	37.7
4	52.0	43.2	51.7	48.3
5	63.0	52.3	63.2	60.3
6	64.5	58.0	65.7	63.8
7	65.8	61.3	66.0	63.8
Half fertilization				
1	22.7	22.3	24.7	23.1
2	30.2	31.9	35.7	31.3
3	39.3	39.8	43.8	37.7
4	53.0	53.8	57.7	51.2
5	64.3	60.7	65.2	60.0
6	69.8	68.0	69.7	66.2
7	71.2	69.2	71.3	68.5
Standard fertilization				
1	22.1	23.5	23.7	22.7
2	28.8	31.9	34.4	30.9
3	39.8	42.5	42.5	41.0
4	53.7	54.8	55.3	54.2
5	64.2	60.8	62.5	58.3
6	70.5	65.7	67.0	61.7
7	69.7	68.7	66.5	61.7
Double fertilization				
1	19.9	19.0	23.6	22.4
2	29.3	29.1	32.6	31.1
3	40.3	39.7	42.8	40.2
4	58.0	52.2	57.7	51.8
5	64.5	62.3	70.5	62.0
6	72.3	70.2	74.2	65.5
7	74.0	76.2	76.0	67.7

Table 5-2. Comparison to number of tillers of the nontransgenic and transgenic rice (cv. Nakdong) to various fertilization rates at different growth stages. WAT, weeks after transplanting; NT, nontransgenic lines; TC, transgenic control; C, cytosol targeted transgenic lines; P, plastid targeted transgenic lines.

WAT	NT	TC	C	P
No fertilization				
1	1	1	1	1
2	1	1	1	1
3	2	2	3	2.7
4	3.3	3	4	3.7
5	4.3	4.3	7.0	6.3
6	6.5	5.3	8.3	7.7
7	9	6.3	9	8.7
Half fertilization				
1	1	1	1	1
2	1	1	1	1
3	2.7	3	3	2.7
4	3.7	4.3	4.7	4
5	6.7	7.7	7.3	4.3
6	9	7.7	10	5.7
7	11	9	10	7.3
Standard fertilization				
1	1	1	1	1
2	1	2	1.3	2
3	3	3.3	4	5
4	4.3	6	8.3	8
5	8.7	9.7	12	13.7
6	11.7	12	13.3	16.3
7	13.7	11.7	14.3	17
Double fertilization				
1	1	1	1	1
2	1.3	1.3	2	2.3
3	1.7	3	3.3	3.7
4	4	4.7	6	5.3
5	7.5	8.3	10.3	9.3
6	10.5	10.7	12.3	11.3
7	15	13	16.3	18

Table 5-3. Comparison to number of leaves of the nontransgenic and transgenic rice (cv. Nakdong) to various fertilization rates at different growth stages. WAT, weeks after transplanting; NT, nontransgenic lines; TC, transgenic control; C, cytosol targeted transgenic lines; P, plastid targeted transgenic lines.

WAT	NT	TC	C	P
No fertilization				
1	5	5.2	5.7	5
2	6.1	6.1	6.7	6.2
3	7	7	8.7	8.3
4	11.3	11	14.3	14.3
5	15.3	17.3	24.7	22.3
6	23	19.3	28.7	24.7
7	22	23.3	32	31
Half fertilization				
1	5	5.4	5.8	5.4
2	6.3	6.9	7.1	6.5
3	8.7	9.7	10	8.7
4	14	17.3	15.3	14
5	22	25.3	25	18
6	29	30.3	30.7	22.7
7	36	34	35.3	27.3
Standard fertilization				
1	5	5.7	6	6
2	6.2	8.4	7.8	9.3
3	9	12.3	12.7	15
4	16	20.7	25.3	29.3
5	27.3	33.3	40.3	47
6	37	39.7	46.3	53.3
7	47	47	51	55.7
Double fertilization				
1	5	5.2	5.8	5.8
2	6.9	7	8	8.7
3	7.7	10.3	13	14
4	15	18	19.7	19.7
5	27.5	27.7	32	31.3
6	34	35	42.7	39
7	46	52	56	53

나. 건답조건에 의한 형질전환 벼의 생육반응

형질을 전환하지 않은 벼와 형질을 전환한 벼를 이앙 후 30일 동안 관수를 억제함으로써 건답 조건을 만들고 이러한 조건에서의 생육을 조사하였다. 형질을 전환하지 않은 벼와 형질을 전환한 벼의 생장은 건답 조건하에서 매우 억제되었는데 이들 식물체의 생육을 분얼수 또는 엽수로 나타낸 경우 이앙 후 7주에서 답수 조건에서의 대조 벼에 비해 각각 25, 45%의 수준으로 감소하였다. 그러나 세포질에 *B. subtilis* Prottox 유전자를 발현시켜 형질을 전환한 벼와 색소체에 *B. subtilis* Prottox 유전자를 발현시켜 형질을 전환한 벼와의 생장 감소는 서로 유의한 차이가 없었다. 건답 조건하에서의 형질을 전환하지 않은 벼 또는 형질을 전환한 벼는 답수 조건에서의 대조 벼보다 분얼 개시시기가 더 늦었으며, 건답 조건에 의한 생육 저하는 세포질에 *B. subtilis* Prottox 유전자를 발현시켜 형질을 전환한 벼보다 색소체에 *B. subtilis* Prottox 유전자를 발현시켜 형질을 전환한 벼가 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 그러나 초장의 경우에는 건답 조건에 의한 분얼수 또는 엽수의 감소만큼 이루어지는 않았다. 건답 조건하에서의 형질을 전환하지 않은 벼와 형질을 전환한 벼의 생장감소가 서로 유의한 차이는 없었다(Tables 5-4, 5, 6).

Table 5-4. Comparison to plant height (cm) of the nontransgenic and transgenic rice (cv. Nakdong) under drought and wet paddy conditions. WAT, weeks after transplanting; NT, nontransgenic lines; TC, transgenic control; C, cytosol targeted transgenic lines; P, plastid targeted transgenic lines.

WAT	NT	TC	C	P
Drought condition				
1	18.8	20	21.3	21.8
2	22.8	26.2	31.4	31.5
3	33.3	29.7	38.7	37
4	47.5	42.2	49	49
5	55.8	48.7	53.7	54.3
6	57.3	55	56.8	62
7	65.2	63.3	60.7	63
Wet condition				
1	22.1	23.5	23.7	22.7
2	28.8	31.9	34.4	30.9
3	39.8	42.5	42.5	41.0
4	53.7	54.8	55.3	54.2
5	64.2	60.8	62.5	58.3
6	70.5	65.7	67.0	61.7
7	69.7	68.7	66.5	61.7

Table 5-5. Comparison to number of tillers of the nontransgenic and transgenic rice (cv. Nakdong) under drought and wet paddy conditions. WAT, weeks after transplanting; NT, nontransgenic lines; TC, transgenic control; C, cytosol targeted transgenic lines; P, plastid targeted transgenic lines.

WAT	NT	TC	C	P
Drought condition				
1	1	1	1	1
2	1	1	1	1
3	1.3	2.3	1.7	2.3
4	1.7	2.7	2	3
5	2.3	2.7	2	3.3
6	3	2.7	2.3	3.3
7	5	5.3	4	4.3
Wet condition				
1	1	1	1	1
2	1	2	1.3	2
3	3	3.3	4	5
4	4.3	6	8.3	8
5	8.7	9.7	12	13.7
6	11.7	12	13.3	16.3
7	13.7	11.7	14.3	17

Table 5-6. Comparison to number of leaves of the nontransgenic and transgenic rice (cv. Nakdong) under drought and wet paddy conditions. WAT, weeks after transplanting; NT, nontransgenic lines; TC, transgenic control; C, cytosol targeted transgenic lines; P, plastid targeted transgenic lines.

WAT	NT	TC	C	P
Drought condition				
1	5	5.5	5.7	5.5
2	6	6.3	6.7	6.7
3	5.3	8.3	6.7	8.7
4	8.7	11	8	11
5	9.7	12.7	9.3	14
6	12	13	10.7	14.3
7	16.3	18.3	14.3	17.7
Wet condition				
1	5	5.7	6	6
2	6.2	8.4	7.8	9.3
3	9	12.3	12.7	15
4	16	20.7	25.3	29.3
5	27.3	33.3	40.3	47
6	37	39.7	46.3	53.3
7	47	47	51	55.7

다. 도복에 의한 형질전환 벼의 생육 반응

지표면으로부터 3cm 엽초 부위를 직각으로 구부려 도복을 유도한 조건에서 형질을 전환하지 않은 벼와 형질전환 벼의 생육을 시기별로 조사하였다. 도복 조건하에서는 형질을 전환하지 않은 벼와 형질전환 벼 모두 생육이 크게 억제되었다. 분얼수는 이앙 후 7주에 조사하였는데 세포질에 *B. subtilis* Prottox 유전자를 발현시켜 형질을 전환한 벼와 색소체에 *B. subtilis* Prottox 유전자를 발현시켜 형질을 전환한 벼에서 각각 11%, 31% 정도 감소되었다. 엽수의 경우에는 세포질에 *B. subtilis* Prottox 유전자를 발현시켜 형질전환 벼와 색소체에 *B. subtilis* Prottox 유전자를 발현시켜 형질을 전환한 벼에서 각각 22%, 34% 정도 감소되었다. 그러므로 색소체에 *B. subtilis* Prottox 유전자를 발현시켜 형질을 전환한 벼의 생장은 세포질에 *B. subtilis* Prottox 유전자를 발현시켜 형질을 전환한 벼보다 도복에 더 큰 영향을 받은 것으로 나타났다. 건답 조건하에서의 벼의 성장 반응과 유사하게 도복 처리에 의해 분얼 개시시기가 더 늦어졌다. 그러나 이러한 성장 감소는 초장을 대상으로 하여 생장을 나타낸 경

우에는 뚜렷하지 않았다. 한편 형질을 전환하지 않은 벼는 도복 처리에 의해 생장이 회복되지 않았으며 그 후 고사하였다. 도복 처리 후 생장이 회복되는 경향이 형질을 전환하지 않은 벼에 비해 형질을 전환한 벼가 더 크게 나타났으므로 형질전환 벼는 도복에 다소 강한 것으로 생각되었다(Tables 5-7, 8, 9).

Table 5-7. Comparison to plant heights (cm) of the nontransgenic and transgenic rice (cv. Nakdong) under lodging and normal conditions. WAT, weeks after transplanting; NT, nontransgenic lines; TC, transgenic control; C, cytosol targeted transgenic lines; P, plastid targeted transgenic lines.

WAT	NT	TC	C	P
Lodging condition				
1	22.6	20.2	23.2	23.5
2	26	25.9	31.6	28.9
3	36	32.3	42	38
4	50.5	49.7	55.3	52.8
5	60	55	59.8	61.8
6	70	56.7	66.8	67.5
7	death	64.8	70.7	67.5
Normal condition				
1	22.1	23.5	23.7	22.7
2	28.8	31.9	34.4	30.9
3	39.8	42.5	42.5	41.0
4	53.7	54.8	55.3	54.2
5	64.2	60.8	62.5	58.3
6	70.5	65.7	67.0	61.7
7	69.7	68.7	66.5	61.7

Table 5-8. Comparison to number of tillers of the nontransgenic and transgenic rice (cv. Nakdong) under lodging and normal conditions. WAT, weeks after transplanting; NT, nontransgenic lines; TC, transgenic control; C, cytosol targeted transgenic lines; P, plastid targeted transgenic lines.

WAT	NT	TC	C	P
Lodging condition				
1	1	1	1	1
2	1	1	1.7	1
3	2	3	3.7	3
4	3	4	7	4
5	3.5	6	9.3	6.3
6	4	7	10.7	8.3
7	death	9.7	12.7	11.7
Normal condition				
1	1	1	1	1
2	1	2	1.3	2
3	3	3.3	4	5
4	4.3	6	8.3	8
5	8.7	9.7	12	13.7
6	11.7	12	13.3	16.3
7	13.7	11.7	14.3	17

Table 5-9. Comparison to number of leaver of the nontransgenic and transgenic rice (cv. Nakdong) under lodging and normal conditions. WAT, weeks after transplanting; NT, nontransgenic lines; TC, transgenic control; C, cytosol targeted transgenic lines; P, plastid targeted transgenic lines.

WAT	NT	TC	C	P
Lodging condition				
1	5	5.2	5.7	5.1
2	6	6	8.3	6.2
3	6.7	9	13.7	9.7
4	11	13.3	24.3	16
5	13.5	19.7	32.7	24
6	11	23	36.7	27.3
7	death	30	39.7	36.7
Normal condition				
1	5	5.7	6	6
2	6.2	8.4	7.8	9.3
3	9	12.3	12.7	15
4	16	20.7	25.3	29.3
5	27.3	33.3	40.3	47
6	37	39.7	46.3	53.3
7	47	47	51	55.7

라. 농약의 종류에 의한 형질전환 벼의 내성 반응

농가에서 가장 많이 사용하고 있는 살충제, 살균제, 제초제 사용에 의한 형질을 전환한 벼의 내성여부 및 생육의 차이를 비교하기 위해 형질을 전환한 벼(C4, P4, TC)와 형질을 전환하지 않은 벼(wild type)를 포함한 4계통을 대상으로 멸구류 방제에 사용되는 살충제 카바메이트계 BPMC(비피유제, 상품명: 밧사) 50%를 이앙 후 15일과 30일에 경엽처리 하였다(Table 5-10). 살충제를 처리하기 전인 이앙 후 1-2주까지의 분얼수와 엽수는 형질전환 계통과 재배종 간에는 차이가 없었으나, 초장에서는 형질전환 벼가 재배종에 비해 다소 큰 경향을 보였다. 살충제 BPMC 처리에 의한 형질전환 벼와 재배종간의 초장, 분얼수 및 엽수는 차이가 없어 형질전환 벼는 BPMC 처리에 의한 내성 차이는 없는 것으로 사료된다. 이화명나방을 방제하기 위해 사용된 cartap hydrochloride(상품명, 파단)를 형질전환 벼와 재배벼에 처리하여 이들 종간에 내성 차이를 조사하였다(Table 5-11). 살충제 처리 전(이앙 후 1-2주)까지는 형질전환 계통과 재배종간에 초장, 분얼수 및 엽수에서 차이가 없었고, 살충제 cartap hydrochloride 처리 후에도 BPMC 처리와 유사하게 형질을 전환한 벼와 형질을 전환하지 않은 벼 간에 내성 차이가 없었다. 벼 잎집무늬마름병을 방제하기 위해 사용된 살균제 validamycin A를 이앙 후 15일과 30일에 처리하여 형질전환 벼와 형질을 전환하지 않은 벼간에 이 병에 대한 내성을 조사하였다(Table 5-12). 살균제 validamycin A를 처리 후 초장에서는 형질전환 벼와 형질을 전환하지 않은 벼간에 차이가 없었다. 그러나 분얼수와 엽수에서는 형질을 전환하지 않은 벼가 형질전환 벼에 비해 다소 떨어지는 것으로 보아 형질을 전환하지 않은 벼가 validamycin A에 대하여 내성이 적은 것으로 사료된다. 살균제 carpropamid 처리에 의해 초장은 형질을 전환하지 않은 벼에 비해 형질전환 벼가 이앙 후 5-6주에 작았으나, 엽수는 오히려 형질전환 벼가 형질을 전환하지 않은 벼에 비해 이앙 후 5-6주에서 많아 상반된 경향을 보였다(Table 5-13). Carpropamid 처리에 의한 형질전환 벼와 형질을 전환하지 않은 벼간에 분얼수 차이는 없었다. 이앙 후 15일에 제초제 pyrazolsulfuron-ethyl + molinate를 처리하고 형질전환 벼와 형질을 전환하지 않은 벼간에 내성 차이를 조사하였다(Table 5-14). 초장과 분얼수에서는 pyrazolsulfuron-ethyl + molinate 처리에 따른 형질전환 벼와 형질을 전환하지 않은 벼간에 내성 차이가 없었다. 그러나 엽수에서는 형질

전환 control이 다른 형질전환 벼와 형질을 전환하지 않은 벼에 비해 훨씬 감소하여 이 제초제에 내성이 적은 것으로 생각되었다.

Table 5-10. Growth responses of the transgenic and nontransgenic T2 generation rice plants (cv. Nakdong) as affected by insecticide, BPMC (50%). Insecticide was treated at 15 and 30 days after transplanting.

WAT	Plant height				Number of tillers				Number of leaves			
	WD	TC	C4	P4	WD	TC	C4	P4	WD	TC	C4	P4
1	23.1	19.7	23.7	24.5	1	1	1	1	5	5	5.8	5.3
2	28.5	30.6	33.1	34.3	1	1.3	1	1	6.3	7.1	7.3	6.8
3	38.5	38.3	42.2	42.2	3	3.3	3.3	3.7	9.3	10.7	6.3	11
4	55.7	53.8	56.7	56.3	4	4	4.3	4.7	15	15.3	16	18.7
5	66.3	66.3	64.2	66	8.5	7.3	7	8.3	28	25	25	29.3
6	72.3	70.3	70.5	71.3	9.5	8	9	9.7	35.5	30.3	30.3	36.3
7	74.5	78.3	76.3	77	11.5	10.7	10.7	11.3	43.5	37.3	39	41.3

Table 5-11. Growth responses of the transgenic and nontransgenic T2 generation rice plants (cv. Nakdong) as affected by insecticide, Cartap hydrochloride (50%). Insecticide was treated at 15 and 30 days after transplanting.

WAT	Plant height				Number of tillers				Numbr of leaves			
	WD	TC	C4	P4	WD	TC	C4	P4	WD	TC	C4	P4
1	20.9	20.1	21.4	21.2	1	1	1	1	4.7	5	5.4	5
2	27.5	28.1	31	28.3	1	1	1	1	6.5	6.1	6.4	6.1
3	38.8	34.8	34.8	36	2.3	2.7	2.7	2.7	7.7	8.3	7.7	8.3
4	52.3	49	49.5	47.2	3	3.7	3.3	3.7	12.3	12.3	12	12.3
5	54.5	62.2	63.5	58.2	6	4.7	4.7	5	22.5	17.7	17.7	19
6	71.5	67.3	66.5	63.3	7.5	6.7	6.3	6.3	29	24.3	24	23.3
7	79.5	73.7	78.5	65	10.5	9.3	8.7	9	39.5	32.3	32.7	31.7

Table 5-12. Growth responses of the transgenic and nontransgenic T2 generation rice plants (cv. Nakdong) as affected by fungicide, Validamycin-A (5%). Fungicide was treated at 15 and 30 days after transplanting.

WAT	Plant height				Number of tillers				Number of leaves			
	WD	TC	C4	P4	WD	TC	C4	P4	WD	TC	C4	P4
1	21.4	22	20.2	22.8	1	1	1	1	5	5.4	5.7	5.2
2	32	30.3	31.7	25.8	1	1	1.3	1	6	7	7.1	7
3	35.5	39.7	39.3	40.5	3	3	3.3	3.3	9	9.7	11	11.7
4	53	53.7	55.8	53	4	4	4.7	4.7	14.7	16.7	16.3	17.3
5	62.3	62.3	60.7	63.2	5.7	7	7.3	7	20.7	25.7	26.7	27.3
6	66.7	70.8	66.2	71.2	7	9	9	8.3	22.7	31.3	34.3	32
7	74	77.8	81.3	74	13	10.7	10.3	11	38	37	41.3	38

Table 5-13. Growth responses of the transgenic and nontransgenic T2 generation rice plants (cv. Nakdong) as affected by fungicide, Carpropamid (15%). Fungicide was treated at 15 and 30 days after transplanting.

WAT	Plant height				Number of tillers				Number of leaves			
	WD	TC	C4	P4	WD	TC	C4	P4	WD	TC	C4	P4
1	20.9	20	20.8	21.7	1	1	1	1	5.1	5.9	6	5.2
2	30.1	31.3	30.7	32.2	1	2	1.7	1.7	7	9.2	8.1	7.4
3	41.8	39.5	38	41.2	3	4.3	3.7	3.7	11	14.3	12	11.7
4	53.7	53.2	51.3	52	5	6.7	5.7	5.7	18	23.3	20	19
5	65	62.5	60.3	63.5	8.3	11.3	11	8.7	29.7	39	39.7	32.7
6	75.7	73.5	69	70.8	10	12.7	13.3	11.7	39	48	48.7	41.7
7	76.8	78.8	72.2	71.8	13	12.3	14.7	14.7	47.3	52	51.7	52.3

Table 5-14. Growth responses of the transgenic and nontransgenic T2 generation rice plants (cv. Nakdong) as affected by herbicide, Pyrazosulfuron-ethyl+molinate. Herbicide was treated at 15 days after transplanting.

WAT	Plant height				Number of tillers				Number of leaves			
	WD	TC	C4	P4	WD	TC	C4	P4	WD	TC	C4	P4
1	19.9	18.8	20.3	23.1	1	1	1	1	5.1	5.2	5.6	5.1
2	28.1	25.9	31.1	29.3	1.3	1	1.7	1	6.8	7	7.8	6.3
3	38.2	36.7	40	38.7	3	2.7	3.3	2.7	9.7	10	11	9
4	47.5	48.5	50.7	47.5	4.3	3.7	5.3	4.7	15.3	12.7	16.3	14.3
5	57	53.5	54.2	52.5	7.7	6	9.3	7	27	23	30.3	24.3
6	66.8	62.3	65.2	61.5	8.7	7	9.3	8	32.3	26.3	36.3	28
7	74.5	73	73	68.7	11.3	8.7	10.3	11	40.7	31	41.7	36.7

마. 제초제와 질소의 상호작용에 의한 형질전환 벼의 생장 및 수량성

B. subtilis Protox 유전자를 세포질과 색소체에 각각 발현시켜 형질을 전환한 벼와 형질전환 control 그리고 형질을 전환하지 않은 벼를 침종하고 최아시켜 답수조건 의 1/5000a pot에 파종하였다. 파종 후 5일에 carfentrazone 0, 50 g ai/ha 수준으로 처리하였고, 농촌진흥청에서 일반 농가에 추천하는 표준 시비량 (N-P-K=11-4.5-5.7kg/10a)과 질소 추천량의 2배로 처리하여 이들 상호작용에 의한 벼의 생육과 수량구성 요소의 차이를 비교하였다. Carfentrazone를 처리하지 않은 질소 표준량 처리에서는 파종 후 4-6주에서 초장은 *B. subtilis* Protox 유전자를 세포질에 발현시킨 2022 계통이 다른 형질전환 벼와 형질을 전환하지 않은 벼에 비해 초장이 컸다(Table 5-15). 질소 배량 처리에서는 형질을 전환하지 않은 벼에 비해 형질전환 control과 색소체에 발현시킨 2032 계통에서 초장감소가 큰 경향을 보였다. 그러나 이들 형질전환 벼와 형질을 전환하지 않은 벼에서 질소질 표준량 처리와 배량 처리간 에 초장은 유사하였다. 질소질 표준량 처리와 carfentrazone 50 g ai/ha 처리에서 형

질 전환 벼와 형질을 전환하지 않은 벼간에 초장의 변화는 Table 5-15에서 보는 바와 같이 각각 무처리에 대비하여 형질 전환 벼가 형질을 전환하지 않은 벼에 비해 이앙 후 2-3주까지는 초장 감소가 적었으나 이앙 후 4-7주에서는 큰 차이가 없었다. 질소질 배량 처리에서는 질소질 표준량 처리와 유사하게 이앙 후 2-3주까지는 carfentrazone 50 g ai/ha 처리에서 형질 전환 벼에 비해 형질을 전환하지 않은 벼의 초장 감소가 컸으나 이앙 후 4-7주에서는 carfentrazone 처리에 의한 초장 감소가 줄어들었고 또한 이들 선발종간에도 차이도 없었다. 형질을 전환하지 않은 벼는 질소질 표준량 처리에 비해 배량 처리에서 carfentrazone 처리에 의한 초장 감소가 컸던 경향이 있었다. 질소질 표준 및 배량 처리와 carfentrazone 처리 후 형질 전환 벼와 형질을 전환하지 않은 벼간에 분얼수 변화를 조사하였다(Table 5-16). Carfentrazone를 처리하지 않고 질소 표준량 및 배량 처리에서는 형질을 전환하지 않은 벼의 분얼속도가 형질 전환 벼에 비해 빠르고, 분얼수에서도 다소 많은 경향을 보였다. 특히, 형질 전환 control은 다른 계통에 비해 분얼수가 적었다. 초장의 결과와 유사하게 형질 전환 벼와 형질을 전환하지 않은 벼에서 질소질 표준량 처리와 배량 처리간에 분얼수는 유사하였다. 질소질 표준량 처리와 carfentrazone 50 g ai/ha 처리에서 형질 전환 벼와 형질을 전환하지 않은 벼간에 분얼수는 초장에서와 같이 이앙 후 2-3주에서는 형질 전환 벼가 형질을 전환하지 않은 벼에 비해 carfentrazone 처리에 의해 분얼수 감소가 적었다. 그러나 이앙 후 3-6주에는 이들 선발종 모두 carfentrazone 처리에 의한 분얼수 감소가 줄어들어 회복되는 경향이었으나, 여전히 형질을 전환하지 않은 벼는 형질 전환 벼에 비해 분얼수 감소가 컸던 경향을 보였다. 질소질 배량 처리와 carfentrazone 50 g ai/ha 처리에서 모든 선발종에서 무처리에 대비한 분얼수는 이앙 후 2-3주까지 감소하다가 4주째부터는 증가하는 경향을 보였다. 그러나 형질 전환 벼에 비해 형질을 전환하지 않은 벼는 이앙 후 2-6주 전 기간에서 분얼수 감소가 컸다. 형질을 전환하지 않은 벼는 질소질 표준량 처리에 비해 배량 처리에서 carfentrazone 처리에 의한 분얼수 감소가 컸던 경향이 있었다. 즉 약해 정도가 심했다. 그러나 형질 전환 벼의 약해는 질소질 표준량과 배량 처리와 관련이 없는 것으로 생각된다. 질소질 표준과 배량 처리 및 carfentrazone 처리에 의한 수량구성 요소의 변화는 표 5-17과 같다. Carfentrazone을 처리하지 않은 질소질 표준과 배량 처리에서는 형질을 전환

하지 않은 벼가 pot당 수수와 천립중이 형질전환 벼에 비해 다소 많았고, 수당입수에서는 반대로 형질전환 벼가 형질을 전환하지 않은 벼에 비해 많은 경향을 보였다. 벼의 수량에서도 형질을 전환하지 않은 벼가 형질전환 벼에 비해 다소 많았던 경향이었고, 이러한 경향은 질소질 표준량 처리보다 배량 처리에서 뚜렷하였다. 질소질 표준량 처리와 carfentrazone 처리에서는 형질을 전환하지 않은 벼가 형질전환 벼에 비해 감소가 컸다. 질소질 배량 처리와 carfentrazone 처리에서는 질소질 표준량 처리와 carfentrazone 처리에 비해 2022 계통을 제외한 모든 처리에서 수량감소가 크게 나타났다. 이와 같은 질소질 표준량 및 배량 처리와 carfentrazone 처리에 의한 벼의 수량감소는 궁극적으로 carfentrazone 처리 후 초기 벼의 생육억제가 수량감소를 야기했을 것으로 생각된다. 하지만 carfentrazone은 현재 어린모 이앙재배에서 30 g ai/ha 수준으로 사용을 시도하고 있다. 그러나 본 연구는 carfentrazone 50 g ai/ha 수준으로 답수직파 답에 처리하여 질소 비료와 상호작용에 의한 약해 유무를 조사하였다.

Table 5-15. Plant height of the transgenic and nontransgenic T3 generation rice plants (cv. Nakdong) as affected by different levels of nitrogen fertilization and carfentrazone. Carfentrazone was treated at 5 days after seeding.

Line	Cafentrazone (g a.i/ha)	Weeks after seeding				
		2	3	4	5	6
-----Standard fertilization-----						
Wild	0	31.6(100)	45.0(100)	56.4(100)	59.1(100)	61.3(100)
	50	22.1(70)	31.0(69)	47.3(84)	56.6(96)	66.1(108)
TC	0	26.9(100)	39.3(100)	52.9(100)	59.2(100)	64.1(100)
	50	22.5(89)	33.4(85)	44.1(83)	54.1(91)	64.2(100)
2022	0	31.8(100)	45.1(100)	59.3(100)	63.2(100)	75.7(100)
	50	27.3(94)	40.5(90)	57.3(93)	60.3(95)	65.4(86)
2032	0	28.0(100)	41.3(100)	56.0(100)	60.4(100)	69.3(100)
	50	22.4(80)	34.2(83)	47.8(85)	56.2(93)	68.0(98)
-----Double fertilization-----						
Wild	0	28.6(100)	44.5(100)	56.4(100)	65.0(100)	75(100)
	50	16.2(57)	25.1(56)	46.1(82)	51.2(79)	59.6(84)
TC	0	24.8(100)	38.6(100)	54.4(100)	62.7(100)	71.8(100)
	50	17.5(71)	31.5(82)	45.9(84)	55.8(89)	65.3(91)
2022	0	29.8(100)	46(100)	61.4(100)	65.2(100)	75.0(100)
	50	22.6(76)	33.5(73)	46.4(76)	55.4(85)	62.6(83)
2032	0	28.1(100)	39.6(100)	58.6(100)	63.8(100)	67.8(100)
	50	26.2(93)	30.5(77)	43.6(74)	53.9(84)	66.1(97)

Table 5-16. Number of tillers of the transgenic and nontransgenic T3 generation rice plants (cv. Nakdong) as affected by different levels of nitrogen fertilization and carfentrazone. Carfentrazone was treated at 5 days after seeding.

Line	Cafentrazone (g a.i/ha)	Weeks after seeding			
		3	4	5	6
-----Standard fertilization-----					
Wild	0	2.3(100)	2.8(100)	2.9(100)	2.8(100)
	50	1.0(43)	1.1(40)	1.8(62)	2.1(76)
TC	0	1.3(100)	1.4(100)	2.8(100)	1.6(100)
	50	1.0(75)	1.0(69)	1.1(40)	1.2(78)
2022	0	1.5(100)	2.0(100)	2.0(100)	1.9(100)
	50	1.0(65)	1.2(61)	1.6(78)	1.9(100)
2032	0	1.4(100)	1.6(100)	2.9(100)	2.4(100)
	50	1.1(76)	1.1(71)	1.7(58)	2.4(100)
-----Double fertilization-----					
Wild	0	2.4(100)	3.1(100)	3.2(100)	3.6(100)
	50	1.1(47)	1.1(36)	1.2(38)	1.6(44)
TC	0	1.3(100)	2.1(100)	2.2(100)	1.8(100)
	50	1.1(84)	1.0(47)	1.6(72)	1.8(100)
2022	0	1.7(100)	2.2(100)	2.5(100)	2.2(100)
	50	1.0(58)	1.0(45)	1.7(65)	1.9(85)
2032	0	1.1(100)	1.9(100)	2.7(100)	2.4(100)
	50	1.1(100)	1.0(53)	1.8(67)	3.0(123)

Table 5-17. Yield components of the transgenic and nontransgenic T3 generation rice plants (cv. Nakdong) as affected by different levels of nitrogen fertilization and carfentrazone. Carfentrazone was treated at 5 days after seeding.

Line	Carfentrazone (g a.i/ha)	Panicles (No./pot)	Spikelets (No./panicles)	Ripened grain (%)	1,000 grain (g)	Yield (g/pot)	Yield index (%)
-----Standard fertilization-----							
Wild	0	12.7	45	85	27	12.9	100
	50	9.7	49	94	26	10.0	78
TC	0	8.7	53	91	24	12.4	100
	50	6.3	61	94	24	9.0	73
2022	0	9.3	53	92	25	10.1	100
	50	8.0	53	91	26	8.7	86
2032	0	10.0	54	85	23	11.1	100
	50	8.3	61	95	24	10.8	97
-----Double fertilization-----							
Wild	0	13.7	54	97	28	16.2	100
	50	9.0	67	88	23	10.1	62
TC	0	9.0	63	91	25	11.1	100
	50	7.3	68	80	21	7.7	69
2022	0	10.3	56	90	24	13.0	100
	50	8.3	52	79	22	10.2	78.4
2032	0	10.7	70	91	23	10.7	100
	50	11.0	71	90	24	13.6	127

바. 재배환경(재식밀도 x 질소) 변화에 따른 벼의 생장 및 수량성(포장시험)

B. subtilis Prottox 유전자를 세포질과 색소체에 발현시켜 형질을 전환한 각각 2계통과 형질을 전환하지 않은 벼를 재식밀도 3수준(소식 30 x 19 cm, 표준 30 x 15 cm, 밀식 30 x 12 cm)과 질소처리를 2수준(표준량 및 배량)으로 달리하여 벼의 생장 및 수량구성 요소를 조사하였다. 이앙 후 4주째 초장은 질소 표준처리의 소식재배에서는 형질을 전환하지 않은 벼에 비해 형질전환 벼가 다소 컸으나 그 밖의 재식밀도에서는 형질을 전환하지 않은 벼와 형질전환 벼들간에 유의적인 차이가 없었다(Fig. 5-5). 질소 배량 처리에서는 소식과 밀식재배에서 형질전환벼가 형질을 전환하지 않은 벼에 비해 다소 초장이 유의적으로 컸다. 전 재식밀도의 질소 배량 처리에 의한 모든 선발종의 초장은 표준량 처리와 큰 차이가 없었다. 이앙 후 4주째 분얼수는 초장의 결과와 유사하게 질소 표준처리의 소식재배에서만 형질을 전환하지 않은 벼에 비해 형질전환 벼가 많았을 뿐 그 밖의 재식밀도에서는 형질을 전환하지 않은 벼와 형질전환 벼들간에 유의적인 차이가 없었다(Fig. 5-6). 질소 배량 처리에서는 밀식을 제외한 소식과 표준 재식밀도에서 형질전환 벼가 형질을 전환하지 않은 벼에 비해 분얼수가 유의적으로 컸다. 형질전환 control은 전 재식밀도와 질소처리에서 형질을 전환하지 않은 벼와 분얼수가 유사하거나 적었다. 전 재식밀도의 질소 배량 처리에 의한 모든 선발종의 분얼수는 표준량 처리에 비해 유의적인 차이가 없었다. 이앙 후 8주째 초장의 경우, 전 재식밀도와 질소처리에서 형질을 전환하지 않은 벼와 형질전환 벼간에 유의적인 차이가 없었다. 단, 전 재식밀도의 질소 배량 처리는 모든 선발종에서 질소 표준량 처리보다 초장이 컸다. 이앙 후 8주째 분얼수의 경우, 이앙 후 4주째 분얼수 결과와 달리 전 재식밀도와 질소처리에서 형질을 전환하지 않은 벼와 형질전환 벼간에 유의적인 차이가 인정되지 않았으나, 소식과 표준 재식밀도의 질소 표준량 처리에서 형질전환 control은 형질을 전환하지 않은 벼보다 분얼수가 훨씬 적었다. 재식밀도와 질소 처리수준에 의한 형질전환 벼와 형질을 전환하지 않은 벼간의 수량구성 요소는 Table 5-18과 같다. 형질전환 벼와 형질을 전환하지 않은 벼간에 수량구성요소에 있어서 차이가 없었고 수량구성요소에 의해 산출한 수량에서도 이들 형질전환 계통과 형질을 전환하지 않은 벼간에 큰 차이가 없거나 오히려 형질전환 벼 계통에서 수량이 많았다.

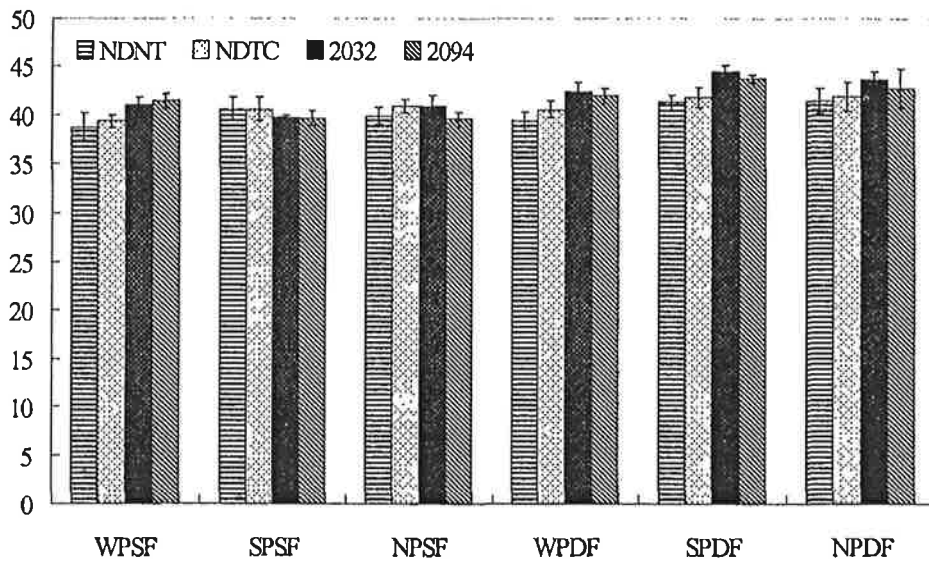


Fig. 5-5. Plant height of the transgenic and nontransgenic T3 generation rice plants (cv. Nakdong; ND) as affected by different levels of fertilization and planting density. Data assessed at 4 weeks after transplanting. (NDNT) Nakdong nontransgenic check; (NDTC) Nakdong transgenic check; (WP) wide planting (30×19 cm); (SP) standard planting (30×15 cm); (NP) narrow planting (30×12 cm); (SF) standard fertilization; (DF) Double fertilization

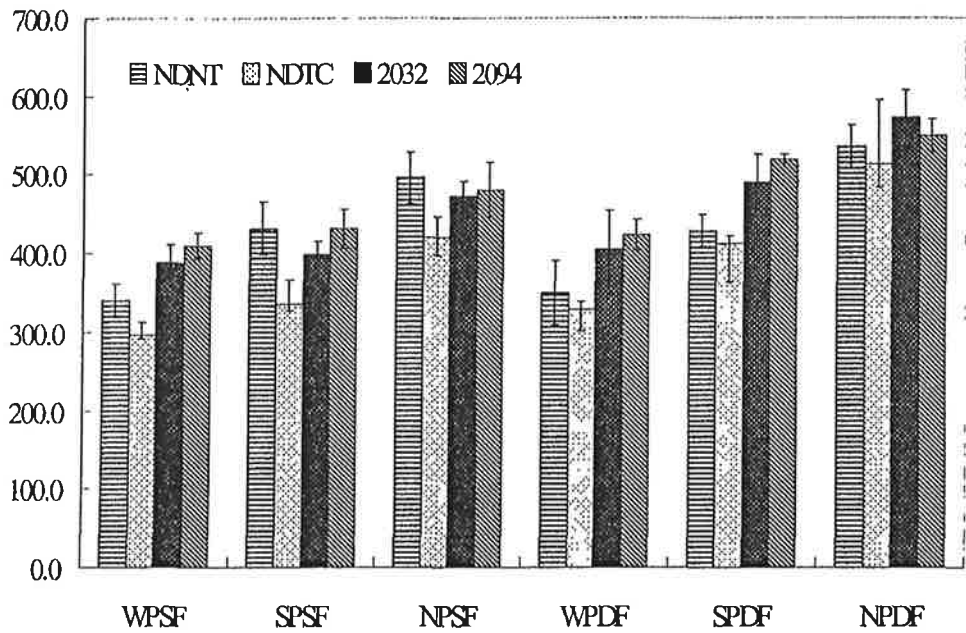


Fig. 5-6. Number of tillers per unit area (m^2) of the transgenic and nontransgenic T3 generation rice plants (cv. Nakdong; ND) as affected by different levels of fertilization and planting density. Data assessed at 4 weeks after transplanting. (NDNT) Nakdong nontransgenic check; (NDTC) Nakdong transgenic check; (WP) wide planting (30×19 cm); (SP) standard planting (30×15 cm); (NP) narrow planting (30×12 cm); (SF) standard fertilization; (DF) Double fertilization

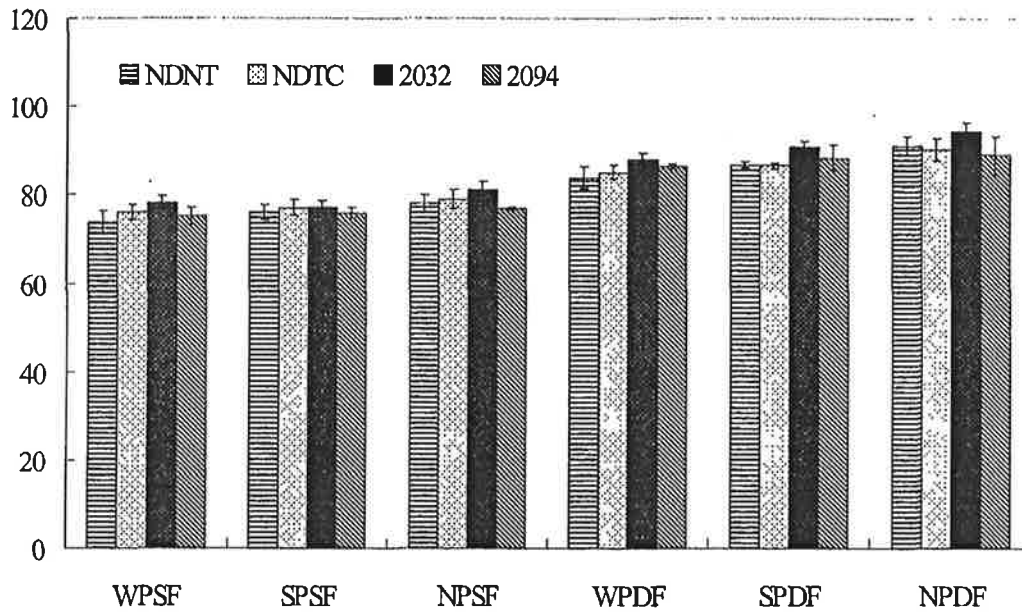


Fig. 5-7. Plant height of the transgenic and nontransgenic T3 generation rice plants (cv. Nakdong; ND) as affected by different levels of fertilization and planting density. Data assessed at 8 weeks after transplanting. (NDNT) Nakdong nontransgenic check; (NDTC) Nakdong transgenic check; (WP) wide planting (30×19 cm); (SP) standard planting (30×15 cm); (NP) narrow planting (30×12 cm); (SF) standard fertilization; (DF) Double fertilization

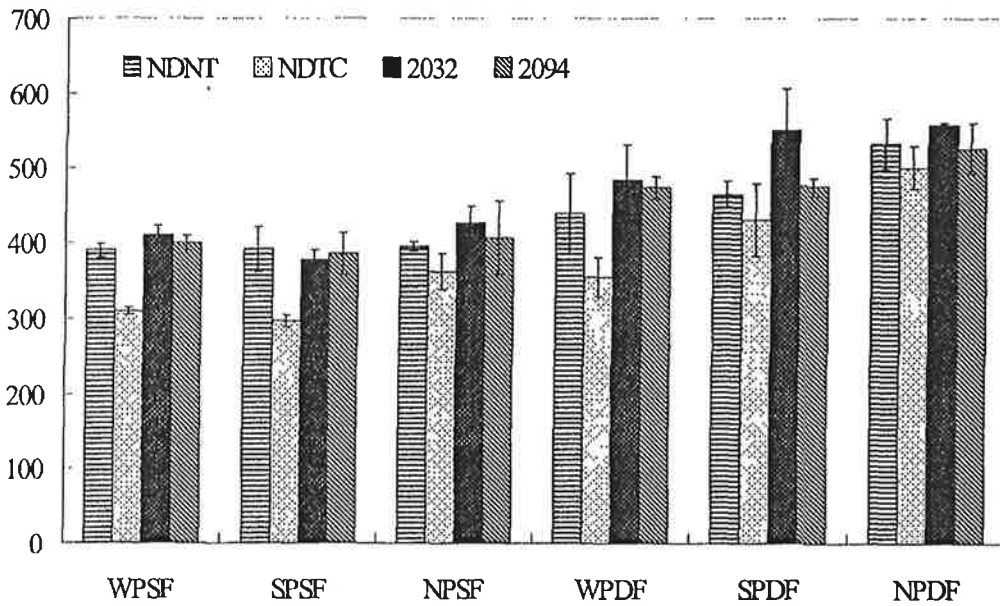


Fig. 5-8. Number of tillers per unit area (m²) of the transgenic and nontransgenic T3 generation rice plants (cv. Nakdong; ND) as affected by different levels of fertilization and planting density. Data assessed at 8 weeks after transplanting. (NDNT) Nakdong nontransgenic check; (NDTC) Nakdong transgenic check; (WP) wide planting (30×19 cm); (SP) standard planting (30×15 cm); (NP) narrow planting (30×12 cm); (SF) standard fertilization; (DF) Double fertilization

Table 5-18. Yield components of the transgenic and nontransgenic T3 generation rice plants (cv. Nakdong; ND) as affected by different levels of fertilization and planting density. (NDNT) Nakdong nontransgenic check; (NDTC) Nakdong transgenic check; (WP) wide planting (30×19 cm); (SP) standard planting (30×15 cm); (NP) narrow planting (30×12 cm); (SF) standard fertilization; (DF) Double fertilization

Density (No. of hill/m ²)	Line	Panicles (No./m ²)	Spikelets (No./panicles)	Ripened grain (%)	1,000 grain (g)	Yield (kg/10a)	Yield (index)
-----Standard fertilization-----							
30×19cm ² (18)	Wild	286	99	91	26	674	100
	TC	265	99	87	24	558	83
	3032	299	110	91	24	727	108
	3094	283	88	91	26	653	97
30×15cm ² (22)	Wild	297	84	89	26	585	100
	TC	277	91	88	24	541	93
	3032	288	95	91	24	605	103
	3094	301	84	91	26	609	104
30×12cm ² (28)	Wild	322	88	92	26	672	100
	TC	308	92	88	25	633	94
	3032	328	97	91	25	716	106
	3094	339	91	92	26	728	108
-----Double fertilization-----							
30×19cm ² (18)	Wild	316	94	92	25	687	100
	TC	318	114	89	25	803	117
	3032	313	121	90	26	891	130
	3094	325	100	89	26	738	107
30×15cm ² (18)	Wild	352	102	91	26	850	100
	TC	327	105	88	24	729	86
	3032	378	112	90	25	935	110
	3094	359	100	88	27	855	101
30×12cm ² (28)	Wild	400	100	91	26	943	100
	TC	400	99	89	24	858	91
	3032	399	106	89	24	904	96
	3094	391	93	90	27	887	94

사. 이양시기별 형질전환벼의 생육 반응

B. subtilis Protox 유전자를 세포질과 색소체에 발현시켜 형질을 전환한 벼 각각 2계통과 형질을 전환하지 않은 벼를 각각 5월 19일, 5월 28일, 6월 5일에 이양하였다. 이양 후 4주와 8주에 초장 및 분얼수를 조사하였다. 각각의 이양시기별 형질을 전환한 벼와 형질을 전환하지 않은 벼의 초장 및 분얼수에는 큰 차이가 없었으나 형질전환 control(TC)은 재배벼와 형질전환 벼 계통보다 이양 후 4주와 8주째에 분얼수가 적은 경향을 보였다(Table 5-19).

Table 5-19. Growth responses of the transgenic and nontransgenic T3 generation rice plants (cv. Nakdong) as affected by different levels of transplanting date.

Transplanting date	Line	4 weeks after transplanting		8 weeks after transplanting	
		Plant height (cm)	No. of tillers	Plant height (cm)	No. of tillers
May 19	Wild	32.9	6.9	66.0	12.5
	TC	32.4	6.0	66.6	7.7
	3072	33.2	8.1	63.8	11.5
	3089	32.8	8.0	61.9	11.4
May 28	Wild	42.6	8.4	68.2	12.7
	TC	40.2	6.1	67.3	7.5
	3072	41.1	8.2	67.0	12.5
	3089	38.7	9.2	65.9	13.1
June 5	Wild	43.1	7.6	68.0	12.2
	TC	41.6	6.1	68.2	9.3
	3072	42.9	8.5	69.3	13.5
	3089	41.9	7.7	67.2	12.9

아. 형질전환 식물의 유전적 안정성 평가

형질전환된 식물체의 후대 유전적 안정성을 검토하기 위하여 제초제 저항성 유전자를 형질전환시킨 개체와 비형질 전환 개체간 약 10여 조합을 작성하여 온실에서 교배하여 얻은 종자를 보관하고 있으며 후대에서 도입 유전자의 발현정도를 토대로 유전 분석을 실시할 예정이다.

자. 미질 안정성

1. 쌀알의 일반 특성

형질전환 벼와 형질을 전환하지 않은 벼(2075)에 대한 쌀알의 외형적인 특징은 장경과 단경의 길이와 천립중을 비교하였는데 Table 5-20과 같았다.

천립중은 15.9~18.8g이며 장경과 단경의 비율은 1.63~1.82로 큰 차이가 없었다. 2005(transgenic control)의 장단경 비율이 가장 낮아 쌀알의 모양이 더 단립종에 가까웠다.

Table 5-20. Morphology of rice grains

	Length (mm)	Width (mm)	L/W ratio	Thousand grain weight (g)
2005	4.44±0.17	2.73±0.09	1.63	16.6
2017	4.65±0.18	2.64±0.10	1.76	17.8
2032	4.70±0.10	2.58±0.11	1.82	16.1
2040	4.57±0.24	2.53±0.14	1.81	15.9
2057	4.53±0.17	2.61±0.14	1.74	16.6
2072	4.65±0.19	2.65±0.14	1.75	17.1
2075	4.56±0.13	2.62±0.13	1.74	16.6
2089	4.62±0.25	2.62±0.10	1.76	18.0
2093	4.61±0.13	2.66±0.12	1.73	17.7
2094	4.92±0.22	2.70±0.10	1.82	18.8

쌀알의 색깔을 낱알과 쌀가루로 비교한 결과는 Table 5-21와 같았다.

밝은 정도를 나타내는 L 값은 2075가 72.03으로 가장 높았고 2017이 낮았으며 노란 정도를 나타내는 b값은 5.87~7.81로 2040가 가장 노란색이 진했다. 쌀가루의 색도도 쌀알의 경향과 비슷하였다.

2005 쌀알의 색깔은 약간 회색 빛이 들었으나 쌀알을 물로 씻었을 때는 모두 깨끗한 흰색을 띠어 2005의 색깔은 도정과정에 의한 것이 아닌가 생각되었다.

쌀알의 알칼리 붕괴도는 쌀알의 조직과 관계가 있는데 2N NaOH 용액에 넣은 후 7시간 후에는 거의 형태가 없어질 정도로 분해되고 호화되어 투명한 조각이 남아있었는데 그 붕괴도는 거의 비슷하였으며 2089, 2093, 2094, 2075는 2040, 2001, 2032, 2057보다 빨리 용해되는 경향을 보였다.

쌀에 함유된 총 전분 함량과 손상된 전분 함량은 Table 5-22과 같다. 건물당 전분 함량은 85.2~89.8%로 2072, 2075, 2093 및 2094는 89% 이상으로 쌀 전분을 이용하여 제품을 만들 때는 다른 것보다 전분 수율을 높일 수 있을 것으로 생각되었다. 손상된 전분은 가열 중에 당으로의 전환이나 효소에 의해 가수분해 될 수 있으며 전분을 이용할 때는 전분의 수율을 저하시킬 수 있다. 반면 손상전분이 취반시 단맛을 줄 수 있으므로 쌀을 가공할 때와 취반용으로 사용할 때에 따라 품질에 영향을 줄 수 있다. 반면 취반시에는 가열시 용해성 전분이 증가될 수 있고 이로 인해 밥맛이 단맛을 가질 수 있어 맛에 좋은 영향을 줄 수 있다. 손상전분은 2057이 가장 낮았으며 2005가 가장 많았다.

2. 쌀의 일반성분

쌀가루의 일반성분을 분석한 결과 Table 5-23와 같이 단백질, 회분 및 총 지질 함량은 각각 0.18~0.33%, 1.05~1.48%로 큰 차이는 없었지만 2017과 2075가 총 지질이 비교적 많은 경향을 보였다.

분리한 쌀 전분의 일반성분 함량은 회분이 0.06~0.15%, 총 지질이 0.45~1.10%로 0.26~0.83%가 전분과 결합된 지질의 형태로 들어 있음을 알 수 있었다 (Table 5-24). 쌀가루의 단백질 함량은 7.1~8.1% 범위로 시료간의 큰 차이는 없었으며, 물로만 추출하여 만든 전분의 경우에도 전분에서 단백질의 제거가 적어 4.5~5.6% 범위였다. 쌀에 함유된 지질은 소량이지만 품질과 관련이 있으며 가열할 때 전분의 팽윤력에도 영향을 주는 것으로 알려져 있다.

Table 5-21. Color values of rice grains and rice flours

		L	a	b
2005	*G	68.53±0.91	-1.25±0.03	6.90±0.13
	**F	92.17±0.84	-0.96±0.04	3.98±0.10
2017	G	67.13±0.77	-1.26±0.09	7.50±0.18
	F	92.39±0.01	-1.01±0.02	4.34±0.03
2032	G	70.08±0.05	-1.41±0.03	7.52±0.06
	F	92.77±0.83	-1.01±0.02	4.37±0.02
2040	G	71.20±0.01	-1.36±0.01	7.81±0.07
	F	92.60±0.02	-1.00±0.03	4.54±0.03
2057	G	69.91±1.06	-1.16±0.07	6.88±0.07
	F	92.95±0.03	-0.98±0.02	4.16±0.01
2072	G	70.03±0.10	-1.31±0.05	6.96±0.02
	F	92.16±0.06	-0.95±0.01	4.34±0.02
2075	G	72.03±0.11	-1.38±0.08	7.36±0.08
	F	92.92±0.06	-0.97±0.02	4.20±0.01
2089	G	67.35±0.18	-1.47±0.04	6.04±0.05
	F	93.15±0.00	-1.06±0.02	4.18±0.01
2093	G	68.77±0.95	-1.45±0.04	5.87±0.09
	F	93.01±0.88	-1.13±0.12	3.96±0.08
2094	G	67.68±0.07	-1.35±0.04	6.08±0.07
	F	93.72±0.01	-1.05±0.01	4.10±0.01

*G : Grain

**F : Flour

L: lightness, a: redness, b: yellowness

Table 5-22. Total starch(%) and damaged starch(%) of rice flours

Sample	Total starch	Damaged starch
2005	85.7	13.6
2017	85.6	10.5
2032	87.3	12.1
2040	85.2	11.1
2057	85.8	9.5
2072	89.0	12.1
2075	89.5	10.9
2089	88.8	11.1
2093	89.2	12.6
2094	89.8	11.7

Table 5-23. Proximate compositions of non-waxy rice flours

Samples	Moisture (%)	Protein (%)	Ash (%)	Lipid (%)	
				Crude	Total
2005	11.33	7.48	0.28	0.28	1.05
2017	10.24	8.03	0.33	0.30	1.43
2032	11.47	7.19	0.28	0.26	1.10
2040	11.49	7.10	0.27	0.23	1.31
2057	11.31	7.36	0.30	0.16	1.17
2072	11.39	7.28	0.27	0.25	1.11
2075	11.45	7.40	0.26	0.32	1.48
2089	11.47	8.08	0.22	0.26	1.17
2093	11.28	7.53	0.22	0.22	1.09
2094	11.20	7.61	0.18	0.27	1.13

Table 5-24. Proximate compositions of non-waxy rice starches

Samples	Moisture (%)	Protein (%)	Ash (%)	Lipid (%)	
				Crude	Total
2005	8.16	4.35	0.07	0.07	0.75
2017	7.35	5.31	0.06	0.07	0.79
2032	9.00	4.56	0.10	-	0.64
2040	7.92	4.61	0.06	-	0.78
2057	8.53	4.64	0.11	-	0.70
2072	8.23	4.52	0.12	0.14	0.72
2075	8.02	5.28	0.10	0.27	1.10
2089	7.55	5.35	0.15	0.18	0.45
2093	7.01	5.60	0.15	0.19	0.78
2094	8.14	5.56	0.12	0.17	0.60

3. 쌀의 이화학적 특성

10종류 쌀의 아밀로오스 함량은 Table 5-25과 같이 17.6~22.3%로 2005가 가장 낮아 아밀로오스 함량으로 평가할 때 밥맛이 좋을 것으로 생각되었다. 2017도 다른 시료에 비해 낮은 편이며 2093과 2094가 상대적으로 높았다. 상온에서 물결합능력은 2005가 204.7%로 가장 높았다. 95℃에서의 팽윤력은 22.4~26.1로 시료간에 큰 차이가 없었다. 전분을 분리하여 전분의 이화학적 특성을 비교한 결과 Table 5-26과 같이 아밀로오스 함량은 18.8~23.0%, 물결합능력은 132.6~169.1%로 쌀가루에 비해 낮은 물결합능력을 보였으며 팽윤력은 쌀가루와는 달리 85℃부터 증가하기 시작하여 95℃에는 31.0~35.9로 쌀가루에 비해 1.5배 정도 증가하였다.

Table 5-25. Physicochemical properties of non-waxy rice flours

Samples	Amylose content	Water binding capacity (%)	Swelling power			
			at 65°C	at 75°C	at 85°C	at 95°C
2005	17.6	204.7	4.7	6.9	9.3	25.9
2017	18.9	181.8	5.4	6.6	8.6	22.4
2032	20.2	181.9	5.2	6.9	9.6	23.2
2040	19.7	179.4	5.1	6.9	9.4	22.7
2057	21.4	198.4	5.3	7.1	8.5	25.8
2072	20.0	187.3	5.2	7.1	9.1	25.8
2075	21.1	188.6	5.0	6.9	7.7	23.8
2089	21.1	196.3	5.5	6.9	8.6	24.7
2093	22.3	188.9	6.2	7.5	7.8	22.4
2094	21.3	192.5	6.2	7.4	7.6	26.1

Table 5-26. Physicochemical properties of non-waxy rice starches

Samples	Amylose content	Water binding capacity (%)	Swelling power			
			at 65°C	at 75°C	at 85°C	at 95°C
2005	19.0	152.5	6.1	9.3	13.9	33.7
2017	19.8	146.1	7.0	8.7	12.0	35.9
2032	20.4	137.8	5.2	8.2	12.2	30.6
2040	20.9	157.5	5.6	7.5	10.5	32.8
2057	22.8	132.6	7.8	8.3	12.6	31.4
2072	21.7	148.4	7.0	9.0	13.8	31.9
2075	22.2	154.5	6.0	7.4	10.2	33.1
2089	22.0	160.5	6.4	8.0	11.4	33.1
2093	23.0	169.1	6.5	8.3	11.2	31.7
2094	22.4	139.1	6.4	8.2	10.9	31.0

4. 호화특성

신속점도 측정기에 의한 쌀가루의 호화 특성은 Table 5-27과 같다. 호화개시온도는 66.3- 71.5℃로 2017이 가장 낮았고 다른 시료간에는 큰 차이가 없었다. 신속점도 측정기에 의한 점도는 충분한 물(쌀가루 4 g/25 mL 물)을 넣고 일정 온도로 가열할 때 전분입자의 팽윤과 호화로 인하여 용출된 아밀로오스와 아밀로펙틴에 의해 점도가 증가하는 것을 측정하는 것으로 가열에 따른 전분의 호화 양상을 알 수 있다. 특히 setback은 호화된 전분의 노화와 관련이 있어 setback이 낮으면 노화가 억제된다고 생각하고 있다. Table 5-27에서 보듯이 10개의 시료 전분의 호화 양상이 차이가 나는 것은 전분입자의 결정성의 차이나 아밀로오스와 아밀로펙틴의 사슬길이와도 관련이 있을 것으로 생각되었다.

Table 5-27. Pasting characteristics of rice flours by Rapid Visco Analyzer

	Pasting temperature (°C)	Peak viscosity (RVU)	Final viscosity (RVU)	Breakdown	Setback
2005	70.9	509.3	419.8	196.9	107.4
2017	66.3	486.0	399.1	246.1	159.2
2032	69.9	472.8	351.9	244.5	123.6
2040	70.5	476.1	358.1	236.4	118.4
2057	69.3	515.8	404.1	229.8	118.0
2072	70.4	498.6	395.7	222.7	119.8
2075	71.5	490.6	398.3	218.1	125.8
2089	69.2	482.1	442.7	190.2	150.8
2093	69.3	492.1	433.3	211.6	152.8
2094	69.2	482.1	405.0	215.5	138.4

쌀 전분의 신속점도 측정기에 의한 호화양상은 전분이외의 탄수화물이 제거되었지만 물로 씻어 분리하였기 때문에 위의 일반성분에서 보듯이 단백질이 많이 남아있고 결합지질도 있어 호화개시 온도를 높인 것으로 생각된다(Table 5-28). 또한 전분은 3 g, 14% 수분함량/ 25 mL의 물을 첨가하여 측정하였기 때문에 쌀가루와는 다른 조건이다. 쌀 전분간의 호화양상도 호화개시 온도는 2005가 가장 낮았으며 71.2-74.1℃의 범위를 보였지만 setback은 쌀가루와는 약간 다른 경향을 보였다. 전분만의 특성을 보기 위해서는 분리 정제하여야 하나 우선 취반시 쌀과 다른 음식을 만들 때 쌀의 조건을 보기 위해 물로 전분을 분리하여 비교하였고 분리과정에서 전분에 함유된 일반 성분이나 전분 자체의 차이에 의한 것인지는 좀 더 연구해보아야 할 것으로 생각된다.

Table 5-28. Pasting characteristics of rice starches by Rapid Visco Analyzer

	Pasting temperature (°C)	Peak viscosity (RVU)	Final viscosity (RVU)	Breakdown	Setback
2005	71.2	222.9	200.1	98.3	75.4
2017	73.0	206.1	198.6	68.3	60.8
2032	73.4	232.3	238.7	79.2	85.6
2040	72.2	208.5	219.6	72.4	83.6
2057	72.5	204.1	212.1	77.9	85.9
2072	71.7	205.5	193.1	85.3	72.9
2075	73.9	177.8	207.9	62.5	92.6
2089	72.7	198.5	187.3	75.3	64.1
2093	74.0	186.3	205.9	64.3	84.0
2094	74.1	206.7	208.7	81.8	83.8

5. 밥의 텍스처

취반 후 김을 빼고 밥알을 세 개를 판에 올려놓고 레오메타로 TPA를 찍어 견고성(Hardness), 부착성(Adhesiveness), 탄성(Springiness)와 응집성(Cohesiveness) 등의 텍스처 특성치를 비교한 결과 Table 5-29과 같이 부착성과 탄성에 5% 수준에서 유의적인 차이를 보였다. 2017, 2040, 2089, 2093, 2094가 부착성이 컸으며 나머지 5종류의 쌀이 부착성이 낮았다. 탄성은 2017, 2075가 낮았으며 2005와 2093이 중간정도를 보였다. 밥의 텍스처 측정을 위한 방법은 한알의 밥알을 사용하거나 세알을 사용하여 측정하는 방법과 bulk로 측정하는 방법이 알려져 있는데 쌀알의 크기나 취반 후 밥의 크기 증가, 밥알 사이의 빈 공간 등에 의해 다르게 나타나는 것으로 알려졌다. 쌀알 각각의 특성을 한알 또는 세알 측정법으로 비교가 가능하므로 이 방법을 사용하였다. 견고성이나 응집성은 쌀의 종류에 따라 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Table 5-29. Textural properties of cooked rices

	Hardness	Adhesiveness	Springiness	Cohesiveness
2005	16619.20±1181.72	88.20±60.81 ^{bcd}	0.59±0.10 ^{bc}	0.23±0.05
2017	15041.40±2224.06	153.20±152.30 ^{abc}	0.53±0.10 ^c	0.23±0.08
2032	16927.20±1816.74	87.40±50.85 ^{bcd}	0.63±0.09 ^{abc}	0.29±0.08
2040	16295.30±1653.75	193.20±153.21 ^a	0.64±0.13 ^{abc}	0.28±0.12
2057	16474.30±1999.93	77.00±30.34 ^{cd}	0.64±0.15 ^{abc}	0.29±0.14
2072	17031.72±1463.41	91.00±47.39 ^{bcd}	0.65±0.13 ^{ab}	0.29±0.10
2075	16299.20±1706.73	56.40±29.44 ^d	0.53±0.05 ^c	0.24±0.03
2089	15881.55±1003.83	213.73±141.53 ^a	0.62±0.13 ^{abc}	0.27±0.06
2093	15691.80±1038.98	181.50±85.74 ^{ab}	0.60±0.13 ^{bc}	0.24±0.04
2094	16249.10±931.60	163.20±74.79 ^{abc}	0.73±0.12 ^a	0.32±0.10

6. 관능평가에 의한 밥맛의 특성 비교

취반 후 수분함량은 Table 5-30과 같이 63.0~64.3% 범위의 수분함량을 나타내어 밥맛이 좋은 밥의 경우의 수분함량인 65.0%와 큰 차이를 나타내지 않았다.

Table 5-30. Moisture contents(%) of cooked rices used in sensory measurement

	Moisture contents(%)
2005	64.3
2017	63.2
2032	63.3
2040	64.0
2057	64.0
2072	63.8
2075	63.5
2089	63.0
2093	63.2
2094	64.3

3번 수세한 쌀과 물의 비율을 1:1.5로 조절하여 취반한 후 관능검사를 실시했을 때 $p < 0.05$ 수준에서 10종류의 시료들간에 유의적인 차이를 보이지 않았고, 비교군으로 함께 관능검사를 실시했던 일미벼 또한 10종류의 쌀과 관능적인 성질에 있어서 차이를 보이지 않았다.

관능검사 요원을 훈련시킨 다음 Fig. 5-1과 같은 조건으로 단계별 관능검사를 실시한 결과 Table 5-31와 같다. 전체적인 선호도는 2005가 높았으며 일미벼와 2093이 다음으로 좋았으며 다른 2094와 2075가 낮았다. 모든 관능적인 속성에 대해 유의적인 차이를 보이지 않아 11종류의 쌀은 취반 후 밥맛이 서로 다르지 않음을 보였으며 특히 밥맛이 좋다고 평가된 2005의 경우 취반 후 단맛과 구수한 맛이 높은 평가를 받았다. 밥의 취반 후 밥맛은 취반 직후보다는 저장 후에 달라질 수 있는데 이에 대해서는 추후 연구가 진행되어야 할 것으로 생각되었다.

제 4 절 결과요약

Bacillus subtilis protoporphyrinogen(Protox) 유전자를 *Agrobacterium*을 매개체로 이용하여 전이시킨 후 cauliflower mosaic virus 35S promoter하에서 발현케 한 형질전환 담배와 벼를 유기하였다. 이러한 형질전환 담배와 벼에 대하여 여러 환경조건에서의 생장, 수량성 및 미질안정성을 형질을 전환하지 않은 담배 및 벼와 비교하였다. 형질전환 담배의 생장은 여러 온도, 광도 및 수분조건에서의 생장이 형질을 전환하지 않은 담배에 비해 다소 저하되는 현상이 나타났을 뿐 기타조건에서의 생장은 형질을 전환하지 않은 담배의 생장과 거의 동일하였다.

형질전환 벼의 생장을 무질소 및 질소 표준 시비량의 1/2, 1, 2배 수준에서 조사한 결과, 표준 시비량의 배양시비에서 형질전환 벼가 형질을 전환하지 않은 벼보다 분얼수가 증가하였고, 반면에 무비구와 1/2 시비구에서는 형질전환 벼가 형질을 전환하지 않은 벼보다 분얼수가 적었다. 건담조건하에서의 형질전환벼와 형질을 전환하지 않은 벼간에 생장(초장, 엽수, 분얼수)감소는 서로 유의한 차이는 없었다. 도복처리 후 생장의 회복은 형질전환 벼가 형질을 전환하지 않은 벼에 비해 다소 빨라 형질전환 벼가 도복에 강한 것으로 생각되었다. 또한, 살충제, 살균제 및 제초제에 대한 형질전환 벼의 내성 반응은 형질을 전환하지 않은 벼와 큰 차이가 없었다. Protox 저해제인 carfentrazone과 질소비료 상호작용 연구의 결과, carfentrazone을 처리하지 않은 질소 표준 및 배양 처리에서는 파종 후 2-6주째 형질전환 벼의 초장과 분얼수 및 수확기에 수량과 수량구성 요소는 형질을 전환하지 않은 벼보다 다소 떨어졌다. 그러나 질소 표준 및 배양 처리와 carfentrazone 조합 처리에서는 무처리에 대비하여 형질을 전환하지 않은 벼가 형질전환 계통보다 벼의 생장 및 수량감소가 크게 나타났다. 재식밀도와 질소 비료 수준을 달리하여 형질전환 벼와 형질을 전환하지 않은 벼간에 생장 및 수량성을 포장조건에서 조사한 결과, 이앙 후 4주와 8주째에 초장과 분얼수는 재식밀도와 비료수준에 관계없이 형질전환 벼와 형질을 전환하지 않은 벼간에 유의적인 차이가 없었다. 또한 벼의 수량 구성요소에 있어서도 형질전환 벼와 형질을 전환하지 않은 벼간에 차이가 없었고 수량 구성 요소에 의해 산출된 수량에서도 이들 형

질 전환 계통과 형질을 전환하지 않은 벼간에 차이가 없거나 오히려 형질 전환 벼가 수량이 많은 경우도 있었다. 이앙시기별 생육반응에 있어서 형질 전환 벼는 형질을 전환하지 않은 벼에 비해 초장 및 분얼수에는 큰 차이가 없었으나 형질 전환 control은 재배 벼와 형질 전환 벼에 비해 분얼수가 적은 경향을 보였다. 형질 전환 벼의 미질 안정성을 조사하기 위하여 쌀알의 일반특성 및 성분, 이화학적 특성, 호화특성, 밥의 텍스처, 밥맛의 특성 등을 형질을 전환하지 않은 벼와 비교하였다. 형질 전환 벼와 형질을 전환하지 않은 벼간에는 이러한 특성에 큰 차이가 없어 형질 전환으로 인한 미질의 변화는 없는 것으로 사료되었다. 따라서 *Bacillus subtilis* Prottox 유전자를 전이시켜 cauliflower mosaic virus 35S promoter 하에서 발현케 한 형질 전환 담배와 벼는 Prottox 저해제 제초제에 대해 비교적 높은 저항성을 나타내지만 형질 전환에 따른 생장 및 수량성 변화는 크게 일어나지 않음을 알 수 있다.

제 5 절 참고문헌

- A.A.C.C (1983) Approved methods. 8th ed., American Association of Cereal Chemist, St. Paul, M.N., 76-12
- A.A.C.C (1983) Approved methods. 8th ed., American Association of Cereal Chemist, St. Paul, M.N., 80-60
- A.O.A.C (1990) *Official Method of Analysis.*, 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., p.788
- Akey WC and Machado VS. (1985) *Can. J. Plant Sci.* 65: 357-362.
- Akhtar M. (1991) In: *Biosynthesis of Tetrapyrroles* (Jordan, P. M. ed.) pp. 67-99, Elsevier Science Publishing, New York.
- Becerril JM and Duke SO. (1989) *Pestic. Biochem. Physiol.* 39: 119-126.
- Becerril JM and Duke SO. (1989) *Plant Physiol.* 90: 1175-1181.
- Buege JA and Aust SD. (1978) *Methods Enzymol.* 52: 302-310.
- Camadro JM, Ibrahim NG, and Levere RD. (1984) *J. Biol. Chem.* 251: 5678-5682.
- Camadro JM, Martinge M, Scalla R, and Labbe P. (1991) *Biochem. J.* 277: 17-21.
- Camadro JM, Thome F, Brouillet N, and Labbe P. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 32085-32091.
- Choi KW, Han O, Lee HJ, Yun YC, Moon YC, Kim M, Kuk YI, Han SU, and Guh JO. (1998) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 558-560.
- Clark JM. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16: 9677-9686.
- Dailey HA and Karr SW. (1987) *Biochemistry* 26: 2697-2701.
- Dailey HA. (ed.) In: *Biosynthesis of Heme and Chlorophylls.* pp. 123-161, McGraw-Hill Publishing Co., New York.
- Dailey TA, Meisner P, and Dailey HA. (1994) *J. Biol. Chem.*, 269: 813-815.
- Duke SO, Lee HJ, Duke MV, Reddy KN, Sherman TD, Becerril JM, Matsumoto H, Jacobs NJ, and Jacobs JM. 1997. In: *Weed and Crop Resistance to Herbicides* (De Prado R, Jorrin J, and Garcia-Torres L, eds.). pp. 155-160. Kluwer,

Dordrecht.

- Duke SO, Lydon J, Becerril JM, Sherman TD, Lehnen LP, and Matsumoto H. (1991) *Weed Sci.* 39: 465-473.
- Duke SO, Nandihalli UB, Lee HJ, and Duke MV (1994) *Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.* 559: 191-204.
- Eastin EF. (1971) *Weed Sci.* 19: 261-265.
- Finckh BF and Kunert KJ. (1985) *J. Agric. Food Chem.* 33: 574-577.
- Foyer CH, Lelandais M, and Kunert KJ. (1994) *Physiol Plant.* 92: 696-717.
- Frear DS, Swanson HR, and Mansager ER. (1983) *Pestic. Biochem. Physiol.* 20: 299-310.
- Girotti AW. (1990) *Photochem. Photobiol.* 51: 497-509.
- Han O, Kim O, Kim C, Park R, and Guh J. (1995), *Bull. Kor. Chem. Soc.* 16: .
- Haworth P and Hess FD. (1988) *Plant Physiol.* 86: 672-676.
- Higgins JM, Whitwell T, Corbin FT, Carter GE, and Hill HS. (1988) *Weed Sci.* 36: 141-145.
- Hiscox JD, Israelstam GF. (1979) *Can J. Bot.* 57: 1332-1334.
- Jacobs JM and Jacobs NJ. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* 229: 312-319.
- Jacobs JM and Jacobs NJ. (1987) *Biochem. J.* 244: 219-224.
- Jacobs JM and Jacobs NJ. (1993) *Plant Physiol.* 101: 1181-1187.
- Jacobs JM, Jacobs NJ (1982) *Enzyme* 28: 206-219.
- Jacobs JM, Jacobs NJ, and Duke SO. (1996) *Pestic. Biochem. Physiol.* 55: 77-83.
- Jacobs JM, Jacobs NJ, Borotz SF, and Guerinot ML (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* 280: 369-375.
- Jacobs JM, Jacobs NJ., Sherman TD, and Duke SO. (1991) *Plant Physiol.* 97: 197-203.
- Jacobs JM, Wehner JM, and Jacobs NJ. (1994) *Pestic. Biochem. Physiol.* 50: 23-30.
- Kappas A, Sassa S, and Anderson KE. (1983) In: *The Metabolic Basis of Inherited*

- Disease. (Stanbury JB, Wyngaarden JB, Frederickson DS, Goldstein JL, and Brown MS, eds.), McGraw-Hill, New York. pp. 1301-1384.
- Kenyon WH, Duke SO, and Vaughn KC. (1985) *Pestic. Biochem. Physiol.* 24: 240-250.
- Kim, J.-O., Kim, W.-S., and Shin, M.-S. (1997) A Comparative study on retrogradation of rice starch gels by DSC, X-ray and alpha-amylase methods. *Starch*, 49 : 71
- Klemm DJ and Barton LL. (1987) *J. Bacteriol.* 169: 5209-5215.
- Komives T and Gullner G. (1994) *Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.* 559: 177-190.
- Labbe-Bois R and Labbe P. (1990) In: *Biosynthesis of Heme and Chlorophylls* (Dailey HA. ed.) pp. 235-285, McGraw-Hill Publishing Co., New York.
- Lee HJ and Cho KY. (1996) *J. Photosci.* 3: 1-7.
- Lee HJ and Duke SO. (1994) *J. Agric. Food Chem.* 42, 2610-2618.
- Lee HJ, Ball MD, and Rebeiz CA. (1991) *Plant Physiol.* 96: 910-915.
- Lee HJ, Ball MD, Parham R, and Rebeiz CA. (1992) *Plant Physiol.* 99: 1134-1140.
- Lee HJ, Duke MV, and Duke SO. (1993) *Plant Physiol.* 102: 881-889.
- Lee HJ, Duke MV, Birk JH, Yamamoto M, and Duke SO. (1995) *J. Agric. Food Chem.* 43: 2722-2727.
- Marchuck D, Drumm M, and Saulino A. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19: 1154.
- Matringe M, Camadro JM, Block MA, Joyard J, Scalla R, Labbe P, and Douce R. (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 4646-4651.
- Matringe M, Camadro JM, Labbe P, and Scalla R. (1989) *Biochem. J.* 260: 231-235.
- Matsumoto H and Duke SO. (1990) *J. Agric. Food Chem.* 38: 2066-2071.
- Medcalf, D.C. and Gilles, K.A. (1965) Wheat starch I. Comparison of physicochemical properties. *Cereal Chem.*, 42 : 558
- Montgomery, E.M. and Senti, F.R. (1958) Separation of amylose from amylopectin of starch by an extraction-sedimentation procedure. *J. Polymer Sci.*, 28 : 1
- Nandihalli UB, Duke MV, and Duke SO. (1992) *J. Agric. Food Chem.* 40: 1993-2000.

- Nandihalli UB, Duke MV, and Duke SO. (1992) *Pestic. Biochem. Physiol.* 43: 193-211.
- Nishimura K, Taketani S, and Inokuchi H. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 8076-8080.
- O'Brian MR, Kirshbom PM, and Maier RJ. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8390-8393.
- O'onor N, Mornet R, Matringe M, Clair D, Scalla R, Fujimoto TT, and Swithenbank C. (1992) *Bioorg. Med. Chem.* 2: 339-342.
- Pronprom T, Matsumoto H, Usui K, and Ishizuka K. (1994) *Pestic. Biochem. Physiol.* 50: 107-114.
- Proulx KL and Dailey HA. (1992) *Protein Sci.* 1: 801-809.
- Ramseier TM, Kaluza B, Studer D, Gludemans T, Bisseling T, Jordan PM, Jones PM, Zuber M, and Hennecke H. (1989) *Arch. Microbiol.* 151: 203-212.
- Reddy KN, Nandihalli UB, Lee HJ, Duke MV, and Duke SO. (1995) *Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.* 589: 211-226.
- Ross, A.S., Quail, K.J. and Crosbie, G.B. (1997) Physicochemical properties of australian flours influencing the texture of yellow alkaline noodles. *Cereal Chem.* 74(6) : 814
- Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sasarman A, Chartrand P, Lavoie M, Tardif D, Proschek R, and Lapointe C. (1979) *J. Gen. Microbiol.* 113: 297-303.
- Sasarman A, Letowski J, Czaika G, Ramirez V, Nead MA, Jacobs JM, and Morais R. (1993) *Can. J. Microbiol.* 39: 1155-1161
- Schoch, T.J. (1964) Swelling power and solubility of granular starches, In *Methods in Carbohydrate Chemistry.* Vol. 4, p106, Academic Press, N.Y.
- Sherman TD, Becerril JM, Matsumoto H, Duke MV, Jacobs JM, Jacobs NJ, and Duke SO. (1991) *Plant Physiol.* 97: 280-287.
- Siepkner LJ, Ford M, de Kock R, and Kramer S. (1987) *Biochem. Biophys. Acta,*

- 913: 349-358.
- Slater TF. (1984) *Methods Enzymol.* 105: 283-293.
- Smith AG, Marsh O, and Elder GH. (1993) *Biochem. J.* 292: 503-508.
- Taketani S, Kohno H, Okuda M, Furukawa T, and Tokunaga R. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 7527-7531.
- Taketani S, Nokahashi Y, Osumi T, and Tokunaga R. (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 19377-19380
- Taketani S, Yoshinaga T, Furukawa T, Kohno H, Tokunaga R, Nishimura K, and Inokuchi H. (1995) *Eur. J. Biochem.* 230: 760-765.
- Tischer W and Stortmann H. (1977) *Biochem. Biophys. Acta* 460: 113-125.
- Urban-Grimal D and Labbe-Bois R. (1981) *Mol. Gen. Genet.* 183: 85-92.
- Williams, P.C., Kuzina, F.D. and Hlynka, I. (1970) A Rapid colorimetric procedure for estimation the amylose content of starches and flours. *Cereal Chem.*, 47, 411~420
- Witkowski DA and Halling BP. (1989) *Plant Physiol.* 90: 1239-1242.
- Wright TR, Fuerst EP, Ogg AG, Nandihalli UB, and Lee HJ. (1995) *Weed Sci.* 43: 권미라, 한진숙, 안승요 (1999) 보은 조건이 쌀밥의 관능 특성에 미치는 영향. *한국식품과학회*, 31(1), 45
- 성내경 (1990) SAS/STAT-분산분석. 자유아카데미
- 이신경, 신말식 (1994) 계면활성제 첨가 고구마 전분의 호화와 노화특성. *한국농화학회지*, 37(6) : 463
- 이신영, 변유량, 조형용, 유주현, 이상규 (1984) 쌀전분의 현탁액과 호화액의 유동거동. *한국식품과학회*, 16 : 29
- 장경아, 신명곤, 홍성희, 민봉기, 김광옥 (1996) 취반미의 관능적 특성에 따른 쌀의 분류 및 쌀전분의 이화학적 특성. *한국식품과학회*, 28(1) : 44
- 한승희, 최은정, 오명숙 (2000) 수입쌀과 국산쌀(추정벼)의 취반 특성 비교. *한국식품과학회지*, 16(1), 91

제 6 절 연구실적

1. 학술논문

Choi KW, Han O, Lee HJ, Yun YC, Kim YH, Kuk YI, Han SU, Kim MJ, Guh JO. 1998. Generation of resistance to diphenyl ether herbicide, oxyfluorfen, via Expression of *B. subtilis* protoporphyrinogen oxidase gene in transgenic tobacco, Biosc. Biotech. Biochem., 62 (3), 558-560.

이희재, 신지산, 한성욱, 구자욱. 1998. Oxyfluorfen에 대한 담배의 엽령별 생리적 반응, 한국잡초학회지, 18(1), 69-75.

이희재, 국용인, 정정성, 이성범, 최규환, 한옥수, 구자욱. 1998. Responses of transgenic tobacco plants containing *B. subtilis* protoporphyrinogen oxidase gene to oxyfluorfen and under various environmental conditions, 한국 잡초학회지, 18(3), 237-245.

Choi JS, Lee HJ, Hwang IT, Pyon JY, and Cho KY. 1999. Differential susceptibilities of wheat and barley to diphenyl ether herbicide oxyfluorfen. Pesticide Biochemistry and Physiology 65: 62-72.

Lee HJ, Lee SB, Chung JS, Han SU, Han OS, Guh Ja, Jeon JO, An JS, K GH. 2000. Transgenic rice plants expressing a *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase gene are resistant to diphenyl ether herbicide oxyfluorfen. Plant Cell Physiol. 41(6), 743-749.

Kim CS, Lee HJ, Han O, Back K, Choi E, Guh JO, Chi YT, Lee DJ. 2000. An efficient method to identify oxyfluorfen resistant rice lines by emergence and mortality of seedlings. Journal of Pesticide Science 25: 144-146.

2. 학술발표

Han O. 1996. Effect of hydrophobic environments and reducing agents on the oxidation of protoporphyrinogen IX, 212th American Chemical Society Meeting, Orlando, Florida, August, 25-29.

Han O, Kim O, Kim M. 1996. Heterologous expression and purification of

protoporphyrinogen oxidase from *B. subtilis* in *E. coli*, 농업생물공학 심포지움, p. 200.

Kim MJ, Kim CK, Han SU, Shin JS, Ha HJ, Lee HJ, Guh JO, Han O. 1997. Protoporphyrinogen oxidase gene as a potential target for herbicide resistant plants: I. Heterologous expression and characterization of *B. subtilis* protoporphyrinogen oxidase, 제 2 회 농업과학 심포지움-식물 환경과학의 발전 방향, vol. 2, p. 319-326.

Choi KW, Kuk YI, Han SU, Han O, Lee HJ, Guh JO. 1997. Expression of *B. subtilis* protoporphyrinogen oxidase gen leads to increased tolerance to oxyfluorfen in transgenic tobacco, 16th APWSS, Kuala Lumpur, Malasia, 196-199.

이희재, 국용인, 이성범, 구자욱. 1998. Oxyfluorfen 및 환경 요인에 대한 *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase 유전자 전이 형질전환 담배의 반응, 한국잡초학회지, 18(1), 41-43.

최규환, 이희재, 한옥수, 한성욱, 구자욱. 1998. *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase 유전자의 발현에 의한 oxyfluorfen 저항성 담배의 유기, 한국잡초학회지, 18 (1), 39-40.

이성범, 백경환, 이희재, 한옥수, 정정성, 한성욱, 구자욱. 1999. *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase 유전자 전이를 통한 형질전환 벼의 유기, 한국잡초학회지, 19(2), 57-59.

Kim CS, Lee HJ, Han O, Back K, Han SU, Guh JO. 1999. Novel and efficient method to identify oxyfluorfen resistant rice strains by emergence and mortality of seedlings (Abstr. No. M-8). Proceedings of Biochemistry Society of Korea. p. 190.

정정성, 이희재, 한성욱, 한옥수, 백경환, 이성범, 구자욱. 1999. *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase 유전자 전이 형질전환 벼의 oxyfluorfen에 대한 생리적 반응, 한국잡초학회지, 19(2), 61-62.

Lee HJ, Choi KW, Back KW, Guh JO, Han O, Cho BH, Chi YT. 1999. Development of photodynamic herbicide-resistant plants utilizing *B. subtilis* protoporphyrinogen oxidase, Agricultural Science and Technology for the

Next Generation, Kwangju, Korea, Jun. 1-4, pp50-63.

Lee SB, Lee HJ, Guh JO, Han SU, Chung JS, Han O, Jeon JS, An GH, Back KW. 1999. Transgenic rice expressing a *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase is resistant to diphenyl ether herbicide oxyfluorfen, 한국 분자생물학회 추계학술대회 초록.

정정성, 국용인, 김경문, 정선요, 이희재, 백경환, 구자욱. 2001. *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase 유전자 전이 형질전환 벼의 Protox 저해형 제초제에 대한 생리적 반응, 한국잡초학회지, 21(2), 103-107.

3. 학위논문

이성범. 2000. *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase 유전자 전이를 통한 제초제 저항성 벼의 유기, 전남대 석사논문.

정정성. 2000. Physiological responses of transgenic rice plants expressing a *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase gene to diphenyl ether herbicide, oxyfluorfen, 전남대 석사논문.

정은주. 2001. Characterization of V311M mutant *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase, 전남대 석사논문.