

최 종
연구보고서

GOVP1200204016

635.933152 (19th)
L2937

카네이션의 항바이러스성 및 고품질화를 위한
분자육종기술적용에 관한 연구

Molecular Breeding of Carnation
(*Dianthus caryophyllus* L.)

연구기관
대구가톨릭대학교

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “카네이션의 항바이러스성 및 고품질화를 위한 분자유종기술 적용에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001 년 10 월 29일

주관연구기관명 : 대구가톨릭대학교

총괄연구책임자 : 유 순 남

요 약 문

I. 제 목

카네이션의 항바이러스성 및 고품질화를 위한 분자유종기술적용에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

가. 연구개발의 목적

1. 항바이러스성 카네이션 분자유종
2. 화색조절 카네이션 분자유종

나. 연구개발의 중요성

- 1) 국내의 중요한 화훼작물중의 하나인 카네이션은 주로 CarMV등에 의한 바이러스 감염으로 그 생산이 크게 감소됨 (20~50%). 따라서 항바이러스성 식물체 개발이 시급히 요구됨.
- 2) 교잡육종에 의한 바이러스 내성도입은 multigene도입에 의한 horizontal resistance로 육종에 어려움이 있음.
- 3) 최근 형질전환기술을 토대로, 항바이러스성 작물이 많이 연구되고 있으며, 특히 바이러스 유전자를 이용하여 작물에 바이러스 저항성을도입하는 경우 이미 많은 작물에서 성공사례가 입증되었음. 따라서 이러한 방법의 적용으로 바이러스 저항성 카네이션의 개발이 필요함.

- 4) 카네이션은 9종이상의 바이러스에 의해 감염되어 있는 것으로 보고되어 있음. 따라서 새로이 복합바이러스내성을 부여할 수 있는 유전자분리, 조작 및 형질전환이 필요함.
- 5) 연구개발과정을 통하여 축적되는 형질전환체계 확립기술을 적용하여 새로운 형질을 가진 식물체를 개발하는데 기여할 것임.
- 6) 카네이션의 교잡육종방법에 의한 화색육종은, 다음세대에서 색소의 발현범위가 한정적이며(카네이션에서 청색등), 교잡불임의 경우, 새로운 화색의 발현을 위해서는, 형질전환에 의한 색소유전자의 도입이 현재로서는 유일한 방안이다.
- 7) 화훼류에 대한 대중의 기호도는 화색, 화형, 크기 등에서 계속적인 다양한 변화를 요구하므로, 세계 꽃시장의 추세로 미루어 볼 때 유전공학적 기법을 통해 재래적 육종방법으로는 불가능했던 새로운 꽃색깔에로의 육종은 불가피하다.
- 8) Flavonoid생합성대사경로에 관여하는, DFR gene을 sense, antisense 방향으로 카네이션품종에 도입하여, 형질전환에 의한 화색변이창성으로 고품질 카네이션 품종육성을 위한 화색분자육종 적용을 시도할 필요가 있음.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 항바이러스성 카네이션 분자육종

1) 카네이션 바이러스 분리 및 동정

- Carnation에 necrosis를 일으키는 virus들의 분리 및 동정을 실시

2) CarMV 및 CarRSV 바이러스 유전자조작.

- CarMV와 CarRSV의 35kDa 복제효소 유전자를 plant expression vector에 cloning

3) 카네이션의 조직배양기술 확립.

- 품종별 조직절편을 이용한 식물체재분화 조건확립
- 'HD', 'KM', 'SL'

4) Car항virus성 Cp유전자 식물체내 도입기술 확립

- 조직절편배양을 통한 형질전환

5) 형질전환체의 분석 및 유전자 발현조사

- Genomic DNA의 PCR분석
- Southern blot analysis
- Western blot analysis : Cp유전자의 protein 발현검정

6) 조기강건형질전환체 생산을 위한 발근배지 개선

- 형질전환체의 발근배지의 조성을 달리하여 조건확립

7) 형질전환식물체의 순화 및 포장적응성 검정

- 포장검정을 위한 형질전환체재배 및 특성분석

2. 화색조절 분자유종

1) 재료식물수집

- Carnation의 유전적 inbreed line의 확보

2) DFR유전자분리 및 유전자조작

- Carnation 'Desio' 품종의 꽃잎으로부터 DFR생합성유전자를 분리, 동정하여 plant expression vector에 cloning (pGA748/DFR)

3) 재료품종 조직배양

- 'VG', 'TG', 'DS'

4) 카네이션식물체내로의 pGA748/DFR유전자 형질전환체 형성

- 'VG' 품종에 DFR sense gene 형질전환
- 'TG' 품종에 DFR antisense gene 형질전환

5) 형질전환체 분석 및 표현형조사

- 기내형질전환체 genomic DNA의 PCR분석 (NPTII, DFR)
- 기내형질전환체 genomic DNA의 Southern blot 분석 (NPT II, DFR)
- 포장개화 화색관찰 및 HPLC에 의한 Anthocyanidin분석

6) Bioimaging Analyzer로 DFR, CHS, FHT 유전자를 동정

- 'VG', 'TG', 'DG' 재료품종의 화색유전자를 동정하였음

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

가. 연구개발결과

1. 항바이러스성 카네이션 분자육종

1) Virus Cp gene 유전자조작

- 담배 6종과 *Vigna unguiculata* 'Blackeye'에서는 점종엽과 상엽에서, 명아주속 식물 2종과 *Physalis floridana*, *Phaseolous vulgaris*, *Vigna radiata*, *Vicia faba*, *Tetragonia expansa*에서는 점종엽에서 증상이 나타났고, *Nicotiana rustica*에서만 증상이 나타나지 않았다. 이병잎을 전자현미경을 통하여 ISEM(Immunosorbent Electron Microscopy Test; 면역전자현미경법)조사한 결과 모든 이병잎에서 30-35nm의 구형을 관찰 할 수 있었다.
- CarRSV 정제는 *Vigna unguiculata* 'Blackeye' 총 3850종자를 파종하여, 54회 균주를 점종하여, 약 1.5kg을 수집하였으며, sucrose density gradient centrifugation을 실시하여 순수한 바이러스를 분리하였다. 그 농도는 260nm에서 1.76mg/ml로써 약 1ml을 얻었다. 정제된 CarRSV를 western blot test를 한 결과 35kDa에서 band가 확인이 되었다.
- 정제된 CarRSV를 사용하여 RT-PCR한 결과 약 1.0kb DNA fragment가 진하게, 이병잎에서는 약하게 CarRSV Cp gene이 증폭된 것이 확인되었다. 이를 pUC 10 vector에 ligation하였고, 새로 합성한 pUC-CarRSV CP vector는 DH5 *E. coli*에 transformation 시켰다. *E. coli*에 형질전환된 4개의 colony에서 추출한 CarRSV CP gene을 포함하는 pBin-CarRSV-CP DNA 를 fresh *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 transformation 시켰다. Isolation하여 restriction enzyme site를 분석하여, 4개의 transformant 중에서 2개가 expected CP gene을 포함하는 것으로 CP fragment가 1.0 kb위치 확인되었으며, 이 construction은 카네이션식물체로의 형질전환에 사용하였다.

- 2) 확립된 조직절편 배양조건을 이용하여 CarMV Cp 및 CarRSV Cp 유전자를 *Agrobacterium*-mediated transformation 방법으로 카네이션에 도입하여 transgenic shoot를 얻었으며, PCR과 Southern blot 분석결과 CarMV Cp 유전자를 발현하는 형질전환체로 판명되었다.
- 3) 형질전환식물체의 순화, 포장적응성 및 표현형으로 나타난 형질에 대해 조사하였다. 형질전환식물체의 경우 kanamycin 선발후 기내 생존율은 74%이며 포트로의 이식율은 10% 정도였다. 포트에 생존된 7개체가 형질전환식물체의 대부분은 정상적인 생육상태를 보였으나, 일부 개체는 성장속도가 느리고, 약한 양상을 보였다.
- 4) 앞으로 기내형질전환개체를 포트이식하고, 생물검정으로 CarMV에 대한 내병성을 검정한 후, 특허권을 신청할 계획이며, 그 후 virus내병성 품종육성을 위한, 교잡육종의 모본재료식물로서 원예시험장의 숙근실에도 제공할 예정이다.

2. DFR 화색조절 분자유종

Carnation의 화색은 주로 flavonoid와 chalcone 유도체에 의해서 좌우되는데, 그들의 최종산물은 Pelargonidin (Pg), Cyanidin (Cy), Kaempferl (Km), Quercetin (Qu)이다. 그러나 노란색과 오렌지색깔의 최종산물은 isosalipurposide이다. 카네이션에서 dihydroflavonol 4-reductase (DFR) 효소는 DHK기질을 촉매로 하여 Leucopelargonidin (LPg)을 생성하고, gene A에 의해서 조절되며, recessive allele의 경우는 acyanic flower가 된다. 'Virginie'('VG')품종은 유전적, 생화학적으로 anthocyanidin생합성대사경로가 밝혀진 품종이다. DFR-mutant인 'VG'품종은 DHK산물은 생성하나, gene A와 R가 recessive allele의 경우로써, 꽃색이 흰색이다. 왜냐하면

'VG'는 aa와 rr가 loci에서 recessive alleles로써, DFR와 F3'H의 활성이 없다. Gene A의 recessive alleles (aa)는 dihydroflavonols DHK와 Leucoanthocyanidins LCy 사이의 생합성대사를 방해하고, Gene R의 recessive alleles (rr)은 DHK와 dihydroquercetin (DHQ) 사이의 생합성대사를 방해한다. 적색 'Desio'('DS')와 'Tanga'('TG')는 AA와 rr loci이다.

- 1) 카네이션 mutant 'VG' 품종에 적색 'DS' 품종의 A gene (DFR 생합성 유전자)을 형질전환하여, DHK 기질을 촉매하여 Pelargonidin 생합성대사를 유도하였다.
- 2) 'VG' 품종의 조직절편체는 'DS'의 A gene의 cDNA clone이 포함된, 식물발현 벡터 pGA748/DFR의 DNA가 형질전환되었다. 그 A 유전자로 encoded된 DFR 효소는 DHQ를 LCy으로 전환하여, 'DS' 꽃의 Pg-전구물질을 생산한다. A 유전자의 coding sequence는 CaMV의 35S gene의 promotor와 terminator 사이에 삽입되어 졌고, 그리고 식물발현 벡터 pGA748/DFR로 클로닝된 것이다. 결과적으로 pGA748/DFR sense와 antisense gene이 'VG'와 'TG'의 조직절편으로 형질전환되고, 형질전환된 shoot 중에 1.2%가 pGA748/DFR의 NPTII gene 발현하여, kanamycin에 저항성이 지속적으로 있었다. 그 중 shoots로부터 41 식물체가 형성되어 in vitro와 pot에 자라고 있다.
- 3) 처음으로 4개의 꽃이 개화한, 두 'VG' 형질전환 개체 (sense) 에서, 흰 바탕에 적색점이 들어간 형질전환된 꽃이 피었다. 두 꽃이 개화한 'TG' 형질전환 (antisense gene) 개체에서는 적색 바탕에 흰점이 들어간 꽃이 피었다. 나머지 38 개체에서는 아직 꽃이 피지 않았다. 이로써 'VG', 'TG'에서 유전자가 형질전환된 것이 발현되었다. 그러나 불완전한 발현이었다. 즉, 'VG' 흰색 품종에 DFR sense gene 형질전환 경우, 흰색 바탕에 적색 반점을 나타내었고, 'TG' 적색 품종에 antisense gene 형질전환 경우, 적색 바탕에 흰색 반점이 나타났다.
- 4) 나머지 형질전환 개체의 후대표현형은 앞으로 연구 검토 대상이 될 것이다.

나. 연구성과활용에 대한 건의

- 1) 바이러스 유전자의 확보를 통하여 같은 바이러스가 감염하는 다른 작물에도 적용할 수 있을 것이며, 또 바이러스 유전자 조작기술 확립은 다른 바이러스 유전자의 분리 및 조작을 용이하게 할 수 있을 것으로 사료된다.
- 2) 카네이션의 각종조직배양기술 및 형질전환체계확립은 카네이션에 기타형질의 도입을 가능케 하는 파급효과를 주어 카네이션의 품질개량을 가속화 할 것이다.
- 3) 신규 바이러스 저항성유전자의 분리 및 기술확립은 유용작물의 복합 바이러스내성 개발에 적용할 수 있을 것이다.
- 4) 국내의 다른 연구팀들이 유사한 연구를 수행한다면 동일작물의 경우 직접 사용이 가능하며 타작물에서의 응용가능성도 높다고 판단된다.
- 5) 본 연구에서 개발된 항virus성 카네이션계통은 생물검정이 끝난 다음, 새로운 교잡육종의 재료로 이용이 가능하다.
- 6) 카네이션 화색생합성대사경로 분석기술 확립으로 주요 화훼작물 화색생합성 대사경로분석에 적용할 수 있다.
- 7) 카네이션 화색관련 DFR 생합성유전자 분리, 조작기술 확립으로 주요 화훼작물의 색소조절유전자 분리, 조작에 적용할 수 있다.
- 8) 따라서, 본 연구의 결과물은 특허 출원과 동시에, 원예시험장 화훼과 카네이션 교잡육종의 모본으로 보급하여, 우리 종묘업계의 국제 경쟁력을 높이는 데 도움이 되어야 할 것이다.
- 9) DFR화색유전자의 형질전환 기술확립은 다음단계의 F3'5'H유전자(청색)의 형질전환의 가능성을 보여준다.

SUMMARY

I. Title

Molecular Breeding of Carnation :

1. Development for Viral Disease Resistance in Carnation by Transgenic Technology
2. Transformation of DFR gene in Carnation for Molecular Breeding

II. Objective and Significance of Research

A. Objective

1. To generate multi-viral disease resistant carnation
2. To make carnation transformant of DFR gene for Molecular Breeding

B. Significance

- 1) Viral disease causes a major damage in carnation, up to 30% decrease in productivity has been reported.
- 2) It is difficult to generate viral resistance by the classic plant breeding methodology because viral resistance is widely associated with undesirable characteristics as they can be polygenic in nature.

- 3)The approach to introduce viral gene in crop plants in order to
Therefore, one believes that this approach can be successfully applied
to develop viral resistance in carnation.
- 4)More than 9 viruses were known to infect carnation. Thus, it is very
important to develop technology that protects plants against more than
one virus.
- 5)Accumulation of techniques for gene manipulation and transformation
should help to yield new transgenic plants with agronomically
important traits.
- 6)Breeding flower pigment of carnation by the aid of hybridization
techniques, range for the pigment expression seems to be very
limited(i.e. blue varnation). In case of crossing incompatibility,
occurrence of a new flower-color expression is attainable only when
the introduction of pigment genes through the transformation.
- 7)Populaity of flower crops in much dependant on flower color, form, and
size, etc., and the demand for continuous and versatile changes of
them. It seems urgent to apply a genic transformation for the
development of new flower pigments if considering the world flower
markets.
- 8)Concerning with flavonoid biosynthetic pathways, an introduction of
either DFR sense or antisense genes must be necessary for the flower
pigment mutation in order to bring about molecular flower breeding.

III. The Scope and Content of the Research

1. Development of Viral Disease Resistance in Carnation by Transgenic Technology

1) Isolation of viruses infecting carnation.

- Isolation and identification of viral strains causing severe necrosis in carnation

2) Genetic manipulation of CarMV and CarRSV viruses

- The 35 kDa Cp genes of CarMV and CarRSV were cloned into plant expression vector.

3) Establishment of tissue culture conditions for carnation

- The regeneration condition from tissue explants has been established

4) Establishment of transformation technique

- A transformation procedure using tissue culture system has been developed.

5) Analysis of transgenic plants

- PCR of genomic DNA (*NPT II*, CarMV Cp)
- Southern blot analysis of genomic DNA (*NPT II*, CarMV Cp)
- Western blot analysis (CarMV Cp)

6) Root induction and acclimatization

- Propagation of transgenic plant

7) Acclimatization of transgenic plants for field test

2. Generation of transgenic carnation 'VG' plants expressing the pGA748/DFR constructs

1) Preparation of plant material

- Genetically inbred cultivars:

'Virginie' ('VG'), 'Tanga' ('TG'), 'Desio' ('DS')

2) Isolation of DFR gene and genetic manipulation

- Isolation of DFR gene and subcloning into plant expression vectors (pGA 748/DFR)

3) Establishment of tissue culture conditions for carnation

- The regeneration condition from tissue explants has been established:

'VG', 'TG', 'DS'

4) Establishment of transformation technique for carnation

- Transformation of DFR sense gene in 'VG'
- Transformation of DFR antisense gene in 'TG', 'DS'

5) Analysis of transgenic plants

- PCR analysis for *nptII* gene and Cp gene in the genomic DNA
- Southern blot analysis of genomic DNA
- HPLC assay of anthocyanidins

6) Enzymological bioimaging analysis for the expression of CHS, FHT and DFR gene in flower of carnation

- 'VG', 'TG', 'DS'

IV. Results and Application

A. Results

1. Isolation of CarMV Cp and CarRSV Cp genes, genetic manipulation and transformation

1) Viruses causing necrosis in carnation were isolated and purified. The viruses were temporarily identified as CarMV and CarRSV, as based on ISEM (Immunosorbent Electron Microscopy Test) results. The virus identified as CarMV causing severe necrosis in carnation (30% frequency). Complementary DNA cloning of CarRSV and CarMV genomic RNA are being carried out.

2) In order to obtain 35 kDa Cp gene from CarRSV isolate, we performed RT-PCR using oligomers deduced from the published sequence of Deutsch isolate of CarRSV. The 35 kDa Cp gene of the CarRSV was cloned into plant expression vector. The expression cassette was introduced into the binary vector, and the resulting plasmid was transformed into *A. tumefaciens*. The same procedure was used to clone the 35 kDa Cp gene from CarMV. RT-PCR was performed with oligomers deduced from the published sequence of Deutsch isolate of CarRSV sequence.

3) Tissue culture systems allowing efficient plant regeneration were developed. Leaf explants of carnation were cocultured with *Agrobacterium* harboring CarMV Cp and CarRSV Cp genes, and transgenic shoots expressing the coat protein genes were obtained.

- 4) Transformants were verified by PCR assay, using *nptII* gene-specific primer. Southern blot analyses confirmed that the CarMV CP gene and *npt II* gene were incorporated into the genomic DNA of kanamycin-resistant plantlets. The transformed plantlets were grown *in vitro* and transferred to potting soil and have grown in a green house.
- 5) A few transgenic plants were in a green house and investigated the acclimatization and field performance. Transgenic plants showed 74% survival *in vitro*, and employed for obtaining the acclimated propagants again *in vitro*, whereas only about 10% of the acclimatization occurred in the transformants when grown on pots, most transgenic plants were normally grown, a few plants showed abnormality such as slow growth.
- 6) Bioassays for the transformant may be acquired for the future studies especially on virus-disease (CarMV) resistance in carnation, when taken out of present *in vitro* conditions.

2. Transformation of DFR gene in Carnation for Molecular Breeding

Pigmentation in carnation is caused by flavonoids and the closely related chalcones. Main end products are anthocyanin glucosides based on pelargonidin (Pg) and cyanidin (Cy) and flavonol derivatives based on kaemferol (Km) and quercetin (Qu). In addition, in yellow and orange strains, the chalcone isosalipurposide is accumulated.

Carnation 'Virginie' ('VG') is one of the subjects of investigation in plants in which the pathway of anthocyanidin biosynthesis has been analysed genetically and biochemically. The enzyme dihydroflavonol

4-reductase (DFR) catalyzes the reduction of dihydroflavonols to leucoanthocyanidins. This step is controlled by the gene A. The presence of recessive alleles is correlated with a complete absence of DFR activity resulting in the formation of acyanic flowers.

Because 'VG' contains recessive alleles at the aa and rr loci, it interrupts DFR and F3'H activity. The recessive alleles (aa) of the gene A interrupt the anthocyanin pathway between dihydroflavonols DHK and Leucoanthocyanidins LPg. The recessive alleles (rr) of the gene R interrupt the anthocyanin pathway between DHK and DHQ. 'TG' contains dominant alleles at the AA loci and recessive alleles at the rr loci.

- 1) The carnation DFR-mutant 'VG', which accumulates DHK, shows no flower pigmentation. 'VG' served as a recipient for the transfer of the A gene of carnation 'Desio' ('DS') encoding DFR, which can reduce DHK and thereby provided the intermediate for Pg biosynthesis.
- 2) Leaf explants of 'VG' were transformed with plant expression vector, pGA748/DFR which contained a cDNA clone of the A gene from carnation 'DS'. The A gene encodes DFR which converts DHK into LPg leading to the production of Pg-derivatives in the 'DS'. The coding sequence of the A gene was inserted in between the promoter and the terminator of the 35S gene from CarMV and cloned into the plant expression vector pGA748/DFR. The resulting pGA748/DFR sense and antisense genes were transferred into leaf explants of 'VG' and 'TG', respectively. 1.2% of the surviving shoots expressed the plant expression vector *NPT II* gene and were consequently resistant to kanamycin. From each transformed shoot, 41 plants were surviving.

- 3) Of the first 4 flowering transformants (sense), two transformed 'VG' plants showed red spots on white background coloration on the flowers of both flowering plants. One transformant (antisense gene), two flowers of which were white spots on red background in colour. Another 38 transgenic plants did not flower. Thus a new flower pigmentation has been established in 'VG' and 'TG'. However, unstable expression of flower colour is due to pigmented red spots on white background or white spots on red background of the flower petals.
- 4) The other transformants and the latter phenotype are not yet known, and will be subject of further investigations.

B. Application and suggestion

- 1)The viral genes cloned into plant expression vector can be used to introduce viral resistance into other plants that are infected with the same virus. The establishment of technology necessary for genetic manipulation of virus genome will facilitate manipulation of other plant viral genome.
- 2)Through the establishment of regeneration and transformation system, it is now possible to introduce other useful agronomic traits into carnation.
- 3)The development of new technology to introduce viral disease resistance can be applied to provide broad spectrum virus resistance to other agronomically important crops.
- 4)The regeneration and transformation systems developed in this study are very useful ones enough for other researchers to apply in their studies.
- 5)Lines of cultivars developed for carnation anti-viral expression in this study can be applied as patents for cross-breeding.
- 6)Upon the establishment of analytical technique for the flower pigment pathway in carnation, it can be applicable for analysis of the flower pigment biosynthetic pathways in other flower crops.
- 7)The DFR gene cloned into plant expression vector can be used in introducing DFR gene to other plants infected with the same DFR gene. The establishment of technology necessary for genetic manipulation of flower genome can be applicable for other flower crops.
- 8)Accordingly, as soon as the results obtained in this study are patented, the bred plants can be expanded to use as mother plants for the further cross-breeding by 'National Horticultural Research Institute, Rural Development Administration in Suwon, Korea'. This, in turn, will upgrade our necessary stocks for the international economic strength.

CONTENTS

Heading	1
Summary in Korean	2
Summary in English	10
Contents in English	19
Contents in Korean	20
Text	21
Chapter 1. Introduction	21
Chapter 2. Development of Viral Disease Resistance in Carnation by Transgenic Technology	27
1. Introduction	27
2. Materials and methods	30
3. Results and discussion	39
Chapter 3. Molecular Flower Breeding in Carnation	68
1. Introduction	68
2. Materials and methods	70
3. Results and discussion	76
Chapter 4. Conclusion	94
Reference	99

목 차

제출문	1
요약문	2
영문요약문	10
영문목차	19
목차	20
본문	21
제 1 장 서론	21
제 2 장 항 Virus성 카네이션 분자육종	27
제 1 절 서론	27
제 2 절 재료 및 방법	30
제 3 절 연구결과 및 고찰	39
제 3 장 화색조절 카네이션 분자육종	68
제 1 절 서론	68
제 2 절 재료 및 방법	70
제 3 절 연구결과 및 고찰	76
제 4 장 결론	94
인용문헌	99

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

가. 연구개발목적

I. 항 virus성 카네이션 분자육종

한국의 국내 화훼시장은 2000년 화훼재배현황 농림부자료에 따르면, 현재 총 생산액이 6,649억원으로 절화류가 45.3%(3,012억원), 분화류가 43% (2,685억원), 관상수가 9%(585억원), 기타 약 2.8%(187억원)이다. 생산액 점유비율이 높은 절화의 종류로는 매년 차이는 있지만, 장미(1270억원), 국화(561억원), 백합(281억원), 안개초(196억원), 카네이션(162억원), 거베라(153억원) 순이며, 이러한 비율은 선진국도 비슷하여 앞으로도 이러한 추세가 계속 될 것으로 추측된다. 총 수입현황은 253억원에서 난류가 152억원, 글라디올러스가 5억원, 카네이션 4억원, 장미 5천만원, 그 외 기타 88억원이다. 수출은 총376억원, 장미가 134억원, 국화 61억원, 백합 56억원, 난 42억원, 선인장 36억원으로써, 장미, 국화 백합은 수출이 수입보다 높으며, 카네이션은 주로 묘주를 수입에만 의존하고, 거의 수출되지 않는 상태므로, 수입묘의 자급자족과 수출을 위한 국제 경쟁력을 확보하는 것이 절실히 요구된다.

외국에서 묘주를 수입할 경우 두가지 큰 문제가 있는데, 첫째는 삼수묘로 삼수할 동안 바이러스에 감염되기 쉽다는 것. 이럴 경우 수출용상품으로서의 가치가 상실된다. 둘째는 화란이나 오스트레일리아, 미국등에 식물특허제도가 있어 신품종이 국내에 반입될 경우 로열티를 지급해야 된다는 것 등이다. 두 경우 모두 국내외의 경쟁력약화를 가져온다.

카네이션(*Dianthus caryophyllus* L.)은 국내외적으로 중요한 切花로서 (Zuker, et al, 1999) 국내의 연간농가생산액이 162억원에 이르는 주요 작물로(농림부자료, 2000), 절화농가의 주요 수입원이나, 카네이션의 경우 묘주

를 수입하고, 원래 삼수묘로 수입한 묘주를 재삼수 함에 따라, 현재 재배되는 품종은 거의 전부 virus에 감염되어 있다(Cheon et al., 1992). 국내 카네이션생산시 가장 큰 장애요인으로, 바이러스감염에 의한 감수가 연간 20-30%에 달한다.

바이러스병방제는 곤충이나 선충의 부분적인 전이를 막는 이외에 특별한 화학적 방제법이 없어, 육종학자들에 의해 야생종으로부터 바이러스 저항성인자를 도입하기 위한 육종이 시도되고 있으나, 교잡육종에 의한 바이러스내성유전자의 유전은, 대부분의 내성계통들이 multigene에 의한 horizontal resistance로 어려움이 있고 (Zuker et al., 2001), 품종의 유용형질의 변화 없이, 바이러스저항성만을 도입시키기가 어려운점이 있어, 교잡육종에 의한 바이러스저항성 카네이션품종의 개발은 국제적으로도 아직 뚜렷한 품종을 개발하지 못하고 있다. 이 때문에 분자생물학적으로 병원체의 항바이러스성 유전자를 분리하여 식물체에 도입시킴으로써, 형질전환을 이용한, 바이러스 저항성 품종의 개발이 요청된다.

바이러스 내성 유전자의 도입은 1996년 본연구실에서 카네이션에서 *A. tumefaciens* LBA 4404에 의한 CarMV pGS55 Cp gene을, 잎과 줄기조직을 통해서 형질전환(유와 배, 1996)한 바 있고, 고추에서도 TMV Cp 유전자를 딱잎엽병조직을 통해서 형질전환(유와 배, 1996)하였다. 그리고, 2000년엔 본 과제에서 CarMV Cp 형질전환(유와 배, 2000)과 CarRSV Cp 유전자조작 및 형질전환(유와 배, 2000)에 대해서 발표하였으며, 더 나아가서 2002년엔 TOMV MP gene을 카네이션에 도입하여(유와 이, 미발표) 그 저항성을 후대검정하고 있다. 형질전환기술을 이용한 바이러스저항성 카네이션품종의 개발은 그 성공을 기대할 수 있다.

본 연구는 카네이션에 주로 알려진 9종의 바이러스 중, 주요 피해 바이러스인 CarMV와 CarRSV에 대한, 복합바이러스내성 카네이션품종육성을 위한 기초연구로서, CarMV Cp 와 CarRSV Cp 유전자를 카네이션에 도입하여, CarMV와 CarRSV에 저항성을 나타내는 품종육성을 하고자, 조직절편체를 통한 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 형질전환을 수행하였다.

2. 화색조절 분자유종

카네이션꽃에서 화색은 소비자에게 있어 1차적인 평가기준이자, 품질의 중요한 판단기준이 되며, 상업적으로 팔리고 있는 Carnation의 꽃색깔은 주로 흰색, 노란색, 오렌지색과 여러 종류의 붉은 색임. 그러나 불완전한 발현에 의해서 흰색, 노란색, 옅은 색깔의 배경에 줄무늬, 반점들을 나타내는 것도 있다.

카네이션은 전 세계적으로 장미, 국화와 더불어 3대 절화용 화훼작물로서, 품종이 많고, 화색, 겹꽃, 꽃크기 등이 매우 다양하며, 사계성이라 연중 관상할 수 있어, 많은 사람들에게 애호받고 있다. 카네이션 절화의 시설재배 면적과 생산량이 꾸준히 증가하며 절화용 화훼류에 대한 대중의 기호도는 화색, 화형 등에서, 지속적인 다양한 변화가 요구되므로, 분자유종에 의한 변이의 창성이 요구된다.

최근 분자유전학의 발전으로, 화색을 원하는 유형으로 변화시키는 것이 가능한 'Molecular Flower Breeding'에 많은 관심이 모이고 있다. 많은 화훼작물에서 분자유전학적 기술을 이용하여, flavonoid생합성대사에 관여하는 여러 효소들을 만드는 유전자가 분리·분석되었고, 이를 응용하여 꽃의 화색을 변화시키기 위한 형질전환의 시도는, 옥수수 Dihydroflavonol 4-reductase (DFR) 유전자를 페튜니아에 도입하여, 적벽돌색의 새로운 화색의 페튜니아를 육성(Meyer et al, 1987)한 것을 시발점으로, 여러 화훼작물에서 색소유전자 (sense)의 도입을 통한 화색변이, antisense gene을 이용해 화색생합성대사를 저해하여 꽃색을 없애는 등, 다양한 새로운 화색발현을 유도할 수 있는 가능성이 열렸다.

색소조절유전인자는 예로부터 유전학자, 화학자, 생화학자의 관심을 끌어 왔으나, Flavonoid Biosynthetic Pathway가 아주 복잡하여 어떤 작물에서 전반적으로 밝혀진 경우는 아주 드물며, 한국에 상업적으로 가치가 있는 주요 화훼작물에서 화색생합성대사경로가 단편적으로나마 규명된 것이 드물다. 최근 많은 관심을 불러 일으키고 있는, 화색분자유종으로 체계적인 새로운 화

색의 창출을 위해서는, 재료식물의 생합성대사경로 규명으로 화색유전자의 유전적 조성이 먼저 규명되어야만 한다.

형질전환을 통한 화색육종의 전제조건은, 교잡육종에 의한 색소유전자의 식물체내로의 전이를 통한 화색의 변화와는 달리, 화색생합성대사경로를 밝혀, anthocyanidin 생성 색소유전자중에서, 효소활성이 결여된 mutant (recessive allele) gene을 갖는 inbreed line을 찾고, 어떤 대사경로에 목적화색유전자를 도입할 것인지 결정하여야 한다. 그리고 색소조절유전인자를 분리, 분석하고, 목적유전자를 plant expression vector로 subcloning 한 후, 형질전환을 하여, 새로운 화색유전자를 도입 발현시킴으로써, 자연상태에 존재하지 않는 화색육성이 가능하게 된다.

화색생합성대사에 관한 연구는 2001년 본 연구실에서 백합의 Flavonoid 생합성대사경로(Yu & Forkmann, 2001)와 장미, 카네이션, 글라디올러스등에서 HPLC에 의한 Anthocyanidin 분석(유와 한, 2001)발표를 하였으며, 독일과의 공동연구자인 Forkmann 교수와의 백합의 Flavonoid 생합성대사경로에 관한 발표(Seitz, Yu, Forkmann, 2001)를 하였으며, 백합 ANS gene의 형질전환의 과제가 계속되고 있다. 또한 본 과제에서 화색형질전환에 관한 발표가 1999년에 있었다(유 등, 1999).

본 연구는 carnation mutant 'VG'백색품종에 'DS'적색품종의 A gene (DFR생합성유전자)를 유전자조작한 다음, 'VG'품종에 형질전환하여, DHK기질을 촉매하여Leucopelargonidin Biosynthesis를 유도하는 한편, DFR antisense 유전자를 'TG'품종에 도입하여, DFR불활성을 유도하여, DHK기질의 사용을 억제시켜, 적색변이 화색육성을 유도하여, 고품질카네이션 육성을 위한, 화색분자육종기술 방법의 체계확립을 하고자 하였다. 카네이션의 재료품종의 유전분석을 위한, Flavonoid 생합성대사경로는, 본인과 한독과제의 국제공동연구자인 독일의 Forkmann교수연구실에서 수행하였으며, 본 연구팀에서 분자레벨에서의 gene manipulation과, 상당히 앞서가고 있는 형질전환기술을 적용하여 화색분자육종의 실용화단계에 접근을 시도하였다. 본 연구실에서의 화색형질전환은 재료식물의 생합성대사경로를 밝힌 후의, 유전조성을 규명한 후에 하므로, 우연을 기대하는 수준이 아니라 기대치를 예상 달성할 수 있다고 본다.

나. 연구개발범위

1. 항virus성 카네이션분자유종

1) Carnation virus 분리 및 동정

- 생물검정
- 전자현미경 검정
- 항혈청 검정
- 바이러스분리주 증식
- CarRSV정제
- 정제 CarRSV western blot 검정

2) CarRSV Cp gene 분리 및 유전자조작

- CarRSV Cp 유전자 Total ssRNA 추출
- RT-PCR을 이용한 CarRSV Cp cDNA 합성
- CarRSV Cp gene cloning
- CarRSV Cp gene의 plant expression vector내로의 subcloing

3) 카네이션 조직배양 기술확립

- 품종별 조직절편을 이용한 식물체 재분화 조건확립: 'KM', 'SL', 'HD

4) 형질전환

- Carnation 품종에 pGA482 형질전환체 개발
- Carnation 품종에 CarMV Cp gene 형질전환체 개발
- Carnation 품종에 CarRSV Cp gene 형질전환체 개발

5) 형질전환체 검정

(1)pGA482의 기내 형질전환체의 NPT II gene 검정

- NPT II gene의 PCR분석
- NPT II gene의 Southern blot분석

(2)CarMV Cp gene 형질전환체 검정

- 형질전환체의 PCR분석
- 형질전환체의 Southern Blot분석
- 형질전환체의 western Blot분석 ; Coat protein 발현여부 조사

6) 조기강건형질전환체 생산을 위한 발근배지 개선

- 형질전환체의 발근배지의 조성을 달리하여 조건확립

7) 형질전환식물체의 순화 및 포장재배

- 포장검정을 위한 형질전환체 재배

2. 화색조절 분자유종

1) 재료식물수집

- Carnation의 유전적 inbreed line의 확보: 'VG', 'TG', 'DS'

2) DFR유전자분리 및 유전자조작

- *Dianthus caryophyllus* L. 'Desio'의 꽃잎으로부터의 cDNA library의 합성
- 국내 카네이션 화색 DFR생합성유전자 screening
- DFR유전자 염기서열 분석
- DFR유전자 G/C 함량 분석
- *in vitro* transcription과 translation
- Northern blot 분석
- DFR gene의 Plant Expression Vector내로의 Subcloning

3) 재료품종 조직배양

- 'VG', 'TG', 'DS'

4) 카네이션식물체내로의 pGA748/DFR유전자 형질전환체 형성

- 'VG' 품종에 DFR sense gene 형질전환
- 'TG' 품종에 DFR Antisense gene 형질전환

5) 형질전환체 검정

- 형질전환체 genomic DNA PCR 분석
- 형질전환체 genomic DNA Southern Blot 검정

6) Carnation Flower Flavonoid 분석

(1) Bioimaging Analyzer에 의한 DFR, CHS, FHT 유전자분석

- 'VG', 'TG', 'DS' 재료품종의 화색유전자를 분석하였음

(2) HPLC에 의한 Anthocyanidin 분석

- 'TG', 'VG', 'DS'

7) DFR 형질전환개화개체의 Phenotype 조사

제 2 장 향 Virus성 카네이션분자육종

제 1 절 서 론

본 실험의 재료식물인 카네이션에 감염되는 바이러스는 CarMV (carnation mottle virus), CVMV (carnation vein mottle virus), CRSV (carnation ring spot virus), CLV (carnation latent virus), CERV (carnation etched ring virus), CYSV (carnation yellow stripe virus), CNFV (carnation necrotic fleck virus), CarCV (carnation cryptic virus), CarYSV (carnation yellow stripe virus) 등 9가지가 알려져 있고, 그 중 CarMV는 세계 어느 지역에서나 감염되어 있고, 특히 CarMV와 CarRSV가 복합감염시 치명적인 피해를 주어, 절화수확량과 품질을 크게 떨어뜨린다(Cheon et al., 1992; and Lee, 1992). 이에 대한 해결방안으로 조직배양을 통한 무병주묘의 생산 (Stone, 1963)은 소극적인 예방에 그치므로, 재배과정중의 감염을 막기 위한 방법으로, 형질전환에 의한 항바이러스성 카네이션품종 육성과 복합바이러스내성 카네이션품종 육성이 절실히 요구되어지고 있다.

현재까지의 국내 카네이션에 감염하는, 주된 바이러스는 CarMV와 CarRSV 등으로 알려져 있으며, 이로 인한 피해가 크다. 그러나 최근 국내 카네이션에 감염하는 바이러스의 종류는 이보다는 상당히 많은 것으로 알려져 있다. 국내 Carnation virus에 대한 연구는, CarMV는 국내분리가 되어 항체가 생산되었으며(천정옥 등, 1990), CarRSV의 국내분리와 항체생산은 아직 되어 있지 않다. 그 외 carnation virus에 대한 연구는 보고된 바가 없다.

지금까지 알려진 항바이러스성유전자는 coat protein (Cp), movement porotein (MP), reprecise, sense 혹은 antisense RNA 등이 알려져 있고, 그 중 Cp의 바이러스 저항성이 가장 알려져 있다. 그 기작은 바이러스유전자를 식물체내에서 과다발현시킴으로 uncoating 혹은 recoating을 방해하며, 즉 바이러스가 식물체내에서 증식하는데 필요한 바이러스복제유전자 발현조절단백질과 먼저 결합하여 바이러스복제를 방해하여 저항성을 갖는다 (Palukaitis

and zaitlin, 1984)고 하며, 그 외에 sense방향으로 바이러스유전자를 식물체내로 도입하여 transcriptional level로, 그리고 antisense 방향으로는 post-transcriptional level에서, 도입된 유전자의 transcript의 분해를 유도함으로써, 동일유전자를 갖거나 유사한 염기서열의 antisense strand를 발현시키는 방법으로 저항성을 유도할 수 있다고 하였다. 바이러스저항성유전자의 식물체내로의 형질전환됨으로, 형질전환식물체가 바이러스내성을 발현하는 경우로 알려진 연구는, TMV의 Cp유전자를 도입·발현되어 바이러스저항성 담배식물체를 만든 것을 시작으로 (Sanford and Johnston, 1985), AMV Cp (Alfalfa Mosaic Virus; Tumer et al., 1987)와 PVX Cp (Potato Virus X; Hemenway et al., 1988)에서 바이러스내성이 형질전환담배에 유도되었다. 그러나 Cp유전자의 antisense RNA를 도입한 경우에는 저항성은 기대에 못 미치는 수준이었다 (PVX: Hemenway, 1988, CMV: Cuozzo, 1986, TMV: Powell, 1989).

*Agrobacterium*에 의한 형질전환법은 Ti-plasmid의 T-DNA부분이 거의 안정하게 전이되는 장점이 있어, 많은 쌍자엽식물체에 적용되고 있으나, 일반적으로 카네이션은 형질전환이 어려운 작물로 알려져 있다. 카네이션에서 최초의 형질전환은 잎조직에 *A. tumefaciens* LBA 4404에 의한 *npt II* gene(Lu, et al, 1991)을 형질전환하였고, 그 후 잎과 화변조직에 *A. tumefaciens* AGL0에 의한 GUS gene을 도입하였다(van Altvorst, et al, 1995, 1996). 유용 유전자의 형질전환은, 카네이션줄기조직을 통해서 *A. rhizogenes*에 의한 RoIC gene을 도입한 보고가 최근에 있었다(Zuker, et al, 2001).

바이러스내성 유전자의 도입은, 1996년 본연구실에서 카네이션에서 *A. tumefaciens* LBA 4404에 의한 CarMV pGS55 Cp gene을, 잎과 줄기조직을 통해서 형질전환(유와 배, 1996)한 바 있고, 고추에서도 TMV Cp 유전자를 떡잎엽병조직을 통해서 형질전환(유와 배, 1996)하였다. 더 나아가서 2002년엔 ToMV MP gene을 카네이션에 도입(유와 이, 미발표) 그 저항을 후대검정하고 있다. 형질전환기술을 이용한 바이러스저항성 카네이션품종의 개발은 그 성공을 기대할 수 있다.

본 연구는 카네이션에 주로 알려진 9종의 바이러스 중, 주요 피해 바이러스인 CarMV와 CarRSV에 대한, 복합바이러스내성 카네이션품종육성을 위한 기초연구로서, CarMV Cp 와 CarRSV Cp 유전자를 카네이션에 도입하여, CarMV와 CarRSV에 저항성을 나타내는 품종육성을 하고자, 조직절편체를 통한 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 형질전환을 수행하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. CarRSV Cp gene분리 및 유전자조작

1) 생물검정

CarRSV strain은 DMS(독일미생물연구소)에서 분양받아 지표식물에 증식하여 사용하였고, 생물검정에 사용된 지표식물은 담배속식물 7종, 명아주속식물 2종, 그 외 13종이다. 3차에 걸쳐 확인검정을 하고, 전신감염을 나타내는 4종에 2차에 걸친 재확인 검정을 하였다. CarRSV 이병된 시료의 잎을 위 지표식물에 즙액접종을 하였다. 접종방법은 0.01M (pH 7.0) 인산완충용액으로 시료를 마쇄하여 carborandum (Silicon carbid:CSi, 300-500mesh)을 접종하고자 하는 잎에 뿌린 후 즙액접종을 하였다. 이들은 온실에서 1~2주일 동안 병징을 조사하였다.

2) ISEM (Immunosorbent Electron Microscopy Test: 면역전자현미경) 검정

바이러스입자 관찰을 위해 역염색법(Negative staining)을 사용하였고, 세포학적 관찰을 위해 초박절편법을 사용하였다. ISEM test를 위한 준비는 항혈청을 coating시에는 Formvar carbon-coated 200 mesh nickel grid를 0.1M sodium phosphate buffer (SPB: pH 7.0)에 1:1000(v/v)으로 희석된 단클론항체에 5분간 처리한 다음 SPB 20방울로 grid를 씻고 여과지로 물기를 제거했다. 그 후 grid를 식물즙액 방울에 약 15분간 올려 둔 다음 역시 SPB를 사용해 1:50(v/v)으로 희석된 단클론항체에 그 grid를 15분간 처리한 후 40방울의 중류수로 씻어 바이러스입자를 고정시킨 다음, 염색은 2% uranyl acetate 수용액 5방울로 negative staining한 후 여분의 염색액이 마른 후 grid를 전자현미경하에서 바이러스입자를 관찰했다. 2개의 grid로부터 관찰하였다.

3) 항혈청 반응검정

겔 확산법(Gel diffusion test)을 이용하였다. Ager gel은 0.85% ionagar, 0.01M sodium phosphate buffer (pH 7.0), 1.0% sodium azide를 혼합하여 녹은 agar gel을 샤레(15×8×0.6cm)에 분주하고 실온에 놓아 둔다. 만든 평판에 직경 3~4mm의 구멍을 뚫어 그 속에 항원을 넣고 확산시켜서 구멍 주위에 형성되는 침강원을 관찰한다. 시료는 상엽에 전신감염을 나타낸 *Datura stramonium*, *Nicotiana benthamiana*, *Vigna unguiculata* 'Blackeye'와 접종엽에 국부감염을 나타낸 *Tetragonia expansa*, *Nicotiana benthamiana*를 사용하였다. 시료엽은 채취하여 인산완충액을 (1:6, w/v) 넣고 마쇄한 다음 12,000rpm에서 10분간 원심분리하여, 그 상정액과 항체를 모세관내에서 37℃에서 20분간 반응시켜 결합반응을 현미경으로 관찰하였다.

4) 바이러스분리주 증식

바이러스분리주 증식을 위해서 사용된 균주는 기주식물에 3차의 single local isolation을 거쳐 검정확인한 CarRSV strain을 사용하였다. 기주식물은 전신 감염기주인 *Vigna unguiculata* 'Blackeye'를 파종후 약 3일이 지나면 peatmoss와 perlite를 혼합한 배양토를 사용한 비닐포트에 이식하였고, 약 3-4일이 경과되어 떡잎이 전개되었을때 건전한 유묘를 접종기주로 사용하였으며, 주/야 30/25℃가 유지되는 격리된 식물생장실에서 접종하여 재배하였다.

5) CarRSV 정제

바이러스의 정제는 저온냉동고에 보관된 이병엽 300g을 사용하여 Kassanis법 (1985)으로 정제하였으며, 완충용액으로는 0.2M sodium acetate buffer (pH5.0)을 사용하였으며 thioglycolic acid 포함된 완충용액에서 조직을 마쇄하고 0.8% butanol로 정화하였다. 이를 8% PEG (polyethylene glycol) 8,000 용액에서 원심분리하여 바이러스침전물을 획득하고 sucrose density gradient centrifugation을 실시하여 순수한 바이러스를 분리하였다.

6) 정제 CarRSV Western Blot 검정

정제된 CarRSV와 이병일의 검정방법으로 western blot test를 하였다. 'SDS-PAGE Mighty Small II' gel방법(Pharmacia)을 사용하여 전기영동하였다.

2. CarRSV Cp gene 분리 및 유전자조작

1) CarRSV Cp 유전자 Total ssRNA 추출

CarRSV genomic RNA는 375bp로 이루어져 있으며 4개의 major CarRSV cell-free translation products가 있다. Cp는 그 중 3번째 coding region에 해당 되는데 처음 ATG 개시 codon을 시작하여 1034 nucleotides로 이루어져 있다. 본실험에서 RT-PCR방법으로 CarRSV 게놈 RNA추출은, 정제CarRSV virus partical을 사용하여, Elise방법을 변형시킨 phenol extraction 방법을 독일DMA연구소의 'Winter 방법'을 적용하여 분리하였다.

2) RT-PCR을 이용한 CarRSV Cp cDNA 합성

CarRSV Cp gene의 amplificatoin 을 위한 oligomer는 PC1 5'-TAACTTAAGGATGA-CGTCTAGACAATCCCGAAAAT-3'과 PC2 5'-CCGAATTCACGGGAAGGACGGTTA-3' 으로서 CarRSV Cp gene의 flanking region 과 identity를 가지는 25bp sequence로 구성되었다. Reacton mixture는 95°C(1분) denaturing step과 53°C annealing step(15분) 그리고 72°C(1.5분) extension을 35cycle이 되게 하였다.

3) CarRSV Cp gene cloning

PCR에 의해 amplified된 CarRSV-CP gene은 pUC19 vector에 ligation하였다. 새로 합성한 pUC-CarRSV-CP vector는 *E. coli* DH5α 에 transformation 하였다.

4) Transformation into *Agrobacterium*

4개의 colony에서 추출한 CarMV CP gene을 포함하는 pBin-CarRSV-CP DNA를 fresh *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 transformation하였다. Isolation 하여 restriction enzyme site (*Bam*HI/*Eco*RI)를 분석하였다.

3. 재로품종 조직배양 기술확립

재로품종 조직배양은 재로식물 'Hirodandy'(HD)와 'Virginie'(VG), 'Desio'(DS)품종을 *in vitro* 상태에서 MS (Murashige & Skoog)기본배지에 계대배양하여 4~8주된 무병주에서 잎과 줄기를 채취하여 접종에 사용하였다. 조직배양배지는 MS기본배지에 NAA (α -Naphthalene acetic acid)를 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5mg/l, BAP (6-Benzylaminopurine) 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0mg/l의 조합과 농도를 27가지로 달리하였고, sucrose 30g/l, pH 5.7, agar 8g/l를 첨가한 고체배지를 121°C, 1.4bar에서 15분간 고압증기멸균소독 한 후 사용하였다. 배양환경은 24±2°C, 1,100~1,450 lux 아래에서 16시간 명과 8시간 암상태로 4주간 배양하여 조사하였다.

4. Carnation Virus Cp gene 형질전환

사용균주는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 strain을 host strain으로 하고, 형질전환식물체를 선별할 수 있는 표지유전자로 kanamycin으로 선발된 NPT (neomycin phosphotransferase)II gene이 삽입된 binary vector pGA482, pCarMV Cp, pCarRSV Cp.를 항생제 rifampicin 100mg/l, streptomycin 100mg/l, tetracycline 12.5mg/l, kanamycin 50mg/l가 첨가된 YEP고체배지 (Bacto-peptone 10g/l, Bacto-yeast extract 10g/l, NaCl 5g/l, Bacto-agar 15g/l, pH 7)에서 28°C, 암상태로 배양하여 형성된 single colony를 접종 봉으로 취한 후, 동일항생제를 첨가한 YEP액체배지에서 28°C, 150rpm 으로 24~36시간 현탁배양하여 형질전환에 사용하였다.

형질전환체의 kanamycin선발은 무균묘 계대배양에서 4-8주된 재료식물의 절편체를 0~4일 전처리하여 조직배양에서 callus형성이 좋은 배지 NAA 0.1~0.25mg/l와 BAP 0.5~1.0mg/l에서 2일동안 cocultivation한 후, kanamycin 100mg/l와 carbenicillin 250mg/l이 첨가된 동일배지에 일주간격으로 8회 계대배양하여 형질전환체를 선발하였다.

1) Carnation 품종에 pGA482 gene 형질전환

Plant expression vector pGA482를 'KM', 'SL', 'VG' 품종의 잎과 줄기를 형질전환하였다.

2) Carnation 품종에 CarMV Cp gene 형질전환

Plant expression vector pCarMV Cp를 'KM', 'SL', 'HD' 품종의 잎과 줄기를 형질전환하였다.

3) Carnation 품종에 CarRSV Cp gene 형질전환

Plant expression vector pCarRSV Cp를 'HD' 품종에 잎과 줄기를 형질전환하였다.

5. 형질전환체 검정

1) 기내형질전환체의 NPT II gene 검정(pGA482)

(1) 형질전환체로부터의 DNA추출

액체질소로 동결시킨 약 50mg의 형질전환시료에 isolation buffer (7M Urea, 0.35M Na₂SO₄, 50mM Tris pH8.0, 20mM EDTA, 1% Sarkosyl) 600μl를 넣고 pestle로 파쇄하여 실온에서 5분간, 여기에 20% SDS를 40μl를 넣어 잘 섞은 후 65℃에서 5분간, 5M potassium acetate를 200μl 첨가하여 -20℃에서 10분간 처리하였다. 처리 후 4℃, 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 새로운 tube에 옮긴다음, 450μl의 cold isopropanol을 넣어 -20℃에서 30분간, 이것을 다시 4℃, 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 원심분리후 pellet에 500μl의 TNE buffer와 1.5μl의 RNase를 넣어 실온에서 30분간 반응시켜 RNA를 분해시킨다음, phenol/chloroform추출방법으로 DNA를 순수분리하였다. 앞에서 원심분리한 상등액에 3M NH₄OAc와 100% cold ethanol을 각각 1 : 0.1 : 2의 volume비율로 넣어서 4℃에서 12,000rpm으로 15분간 원심분리한 후 상등액을 제거하고, 가라앉은 pellet에 70% cold ethanol을 2volume비율로 넣어서 DNA를 세척하고, 4℃에서 12,000rpm으로 10분간 원심분리한 다음 건조시켜서, 50μl의 Tris-EDTA buffer로 녹여 genomic DNA를 준비하였다.

(2) NPT II gene PCR분석

Kanamycin배지에서 선발된 형질전환체를 PCR으로 형질전환체의 NPT II gene의 발현을 분석하였다. PCR반응액조성은 PCR buffer (10mM Tris·HCl pH8.3, 50mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.01% gelatin)에 250μM dNTPs, 30pM primer, 2 unit Taq polymerase, 150ng의 genomic DNA를 혼합하여 사용하였으며, 반응액의 표면에 약 20μl의 mineral oil로 피막처

리하였다. PCR은 'MJ Research 회사'의 'MiniCycler 150' PCR기계를 이용하여 pre-denature (94°C, 3분)한 다음 denature (94°C, 2분), annealing (54°C, 1분30초), elongation (73°C, 1분)을 1 cycle로 해서 35cycle동안 증폭시켰다. 증폭이 끝나면 73°C에서 15분간 안정화시킨 다음 10°C에서 유지되도록 하였다. 반응이 끝난 DNA는 0.8% agarose gel 상에 분획하여 NPT II gene이 증폭되었는지 확인하였다.

(3) pGA 482의 NPT II gene 의 Southern Blot 분석

Kanamycin저항성 재분화식물체의 genomic DNA를 *Xba*I으로 digestion한 후 0.6% agarose gel에 전기영동하여 DNA를 변성, 중화시키고, Nylon Membrane에 transfer시켜 UV-light로 cross-linking하였다(Southern, 1975). *npt* II probe는 pGA482를 *Bam*HI/*Hind*III로 digestion (2 kbp)한 것을 사용하였다. Nick translation kit (Amersham)를 이용하여 [α -³²P]ATP로 labelling한 probe를 hybridization solution (0.5 M sodium phosphate pH 7.4, 1 mM EDTA, 1% BSA, 7% SDS)을 넣고 (Church and Gilbert, 1984) 60°C에서 30분동안 prehybridization한후, 같은 hybridization solution에 60°C에서 12시간 hybridization시켰다. Membrane 세척은 2x SSC, 0.1% SDS용액으로 실온에서 10분, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C로 차례로 온도를 높여가며 각각 10분씩, 세척후 실온에서 말린다음 cassette holder에 넣어 -70°C에서 Kodak XAR-5 film에 노출시켰다.

2) Carnation 품종에 CarMV Cp gene 형질전환체 검정

(1) CarMV Cp gene PCR분석

Kanamycin배지에서 선발된 형질전환체를 PCR으로 형질전환체의 pGA Cp

gene의 발현을 분석하였다. PCR반응액조성은 PCR buffer (10mM Tris·HCl pH8.3, 50mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.01% gelatin)에 250μM dNTPs, 30pM primer, 2 unit Taq polymerase, 150ng의 genomic DNA를 혼합하여 사용하였으며, 반응액의 표면에 약 20μl의 mineral oil로 피막처리하였다. PCR은 'MJ Research 회사'의 'MiniCycler 150' PCR기계를 이용하여 pre-denature (94°C, 3분)한 다음 denature (94°C, 2분), annealing (54°C, 1분30초), elongation (73°C, 1분)을 1 cycle로 해서 35cycle동안 증폭시켰다. 증폭이 끝나면 73°C에서 15분간 안정화시킨 다음 10°C에서 유지되도록 하였다. 반응이 끝난 DNA는 0.8% agrose gel 상에 분획하여 Cp gene이 증폭되었는지 확인하였다.

(2) CarMV Cp gene의 Southern Blot 분석

Kanamycin저항성 재분화식물체의 genomic DNA를 *Xba*I로 digestion한 후 0.6% agrose gel에 전기영동하여 DNA를 변성, 중화시키고, Nylon Membrane에 transfer시켜 UV-light로 cross-linking하였다(Southern, 1975). Cp probe는 pGA Cp를 *Bam*HI/*Hind*III로 digestion (2 kbp)한것을 사용하였다. Nick translation kit(Amersham)를 이용하여 [α -³²P]ATP로 labelling한 probe를 hybridization solution(0.5 M sodium phosphate pH 7.4, 1 mM EDTA, 1% BSA, 7% SDS)을 넣고 Church and Gilbert, 1984) 60°C에서 30분동안 prehybridization한후, 같은 hybridization solution에 60°C에서 12시간 hybridization시켰다. Membrane 세척은 2x SSC, 0.1% SDS용액으로 실온에서 10분, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C로 차례로 온도를 높여가며 각각 10분씩, 세척후 실온에서 말린다음 cassette holder에 넣어 -70°C에서 Kodak XAR-5 film에 노출시켰다.

(3) CarMV Cp gene의 Western Blot. 검정

형질전환 카네이션식물체의 조직에 CarMV Cp가 전사 및 단백질로 번역되었는지 여부를 조사하기 위하여, 형질전환된 카네이션을 바이러스에 노출되지 않도록 유지하여, 단백질을 추출하고, 'SDS-PAGE Mighty Small II' gel 방법(Pharmacia)을 사용하여 전기영동하고, western blot 하였다. 즉, 카네이션 1g을 단백질추출용액(50mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% β -mercaptoethanol, 0.13 mg/ml leupeptin)에서 마쇄하며, 원심분리(38,000g, 20분)한 후 100 μ g의 총단백질을 15% SDS-PAGE에서 전기영동하였다. 전기영동된 gel은 10mM CAPS완충용액(3-(cyclohexylamino)-1-propane sulfonic acid, pH11.0, 10% (v/v) methanol)속에서 PVDF membrane (Bio-Rad, 162-0182)에 전이시키고 PVDF membrane에 CMV-ABI strain의 anti Cp mouse polyclonal antibody (Ig), peroxidase conjugate (BM, 1-110-225)를 차례로 부착시킨 다음, 발색액(peroxidase conjugate substrate kit, BM, 1-110-225)으로 Cp단백질 생합성 여부를 확인하였다.

3) Carnation 품종에 CarRSV Cp gene 형질전환체 증식

Kanamycin 배지에서 8주선발후, 생존 shoot를 포트이식을 위해서, 발근배지에서 10개체이상 증식한다.

6. 조기강건 형질전환체 생산을 위한 발근배지 개선

형질전환체의 kanamycin 선발 후의 생존율과 발근 후의 포트생존율을 높이기 위하여, MS기본배지에 무기염류는 1, 1/2, vitamin은 전체, 일부, Sucrose는 30, 50 mg/l, Agar는 8, 12 mg/l 등의 농도를 달리한 16조합에서 배지를 실험조사하였다.

7. 형질전환식물체 순화 및 포장재배

강건묘배지에서 발근된 형질전환개체를 지피모트에 이식한 후 성장상에서 4주 순화시킨 후 화분으로 이식하여 온실에서 재배한다.

제 3 절 연구결과 및 고찰

1. Carnation Virus 분리 및 동정

1) 생물검정

CarRSV분리를 위한 지표식물 6속 22종으로 실험결과는 표 1에서와 같이 *N. rustica*를 제외한 담배6종과 *Vigna unguiculata* 'Blackeye'에서는 접종엽과 상엽에 증상이 나타났고, 명아주속 식물2종과 *Physalis floridana*, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna radiata*, *Vicia faba*, *Tetragonia expansa*에서는 접종엽에 증상이 나타났다(그림1). 전신감염을 나타내는 4종에 2차에 걸친 재확인 검정을 하였다. 기존에 보고된(CMI) CarRSV와 차이를 보였는데, CMI의 보고에 의하면 *T. expansa*와 *P. vulgaris*에서 전신감염을 보인 반면 본 실험에서는 국부감염만을 보였다.

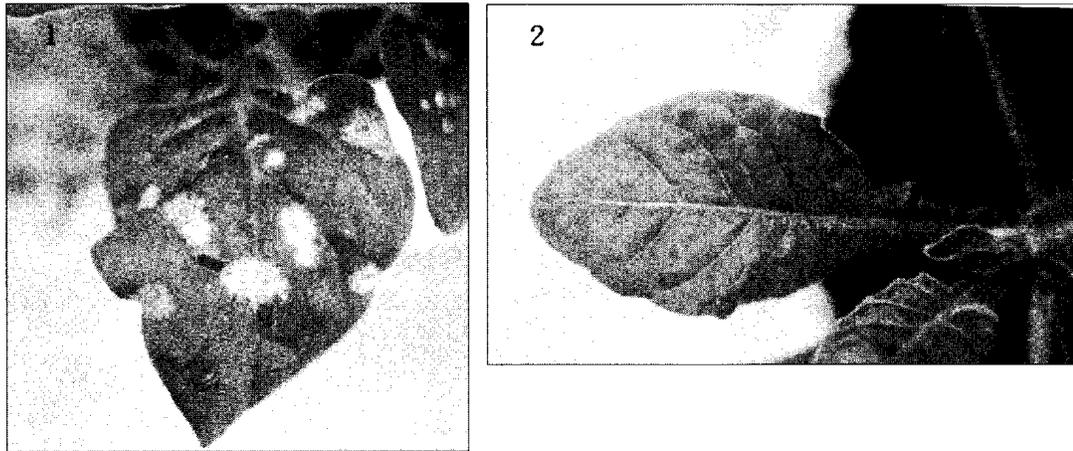


Figure 1. CarRSV inoculated *Tetragonia expansa* (1) and *Nicotiana occidentalis* (2)

Table 1. Results assessed for CarRSV indicators the subjective plants

Family	Species	Reaction on leves of	
		Incolated	Upper
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium amaraticolor</i>	nl	-
	<i>quinoa</i>	nrl	-
Solanaceae	<i>Nicotiana glutinosa</i>	cl	vc, m
	<i>rustica</i>	-	-
	<i>benthamiana</i>	nrl	vc
	<i>occidentalis</i>	cl	vc
	<i>tabacum</i> 'KY-57'	crl	vc
	'X-nc'	crl	vc
	'Bright Yellow'	crl	vc
	<i>Datura stramonium</i>	crl	crl
<i>Lycopersicon esculentum</i>	-	-	
	<i>Physalis floridana</i>	cl	-
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i>	-	-
	<i>Cucurbita pepo</i>	-	-
Leguminosae	<i>Vigna unguiculata</i> 'Blackeye'	nl	sm
	<i>radiata</i>	nl	-
	<i>Phaseolous vulgaris</i>	nl	-
	<i>Vicia faba</i>	nl	-
	<i>Lathyrus sativus</i>	nl	-
Aizoaceae	<i>Tetragonia expansa</i>	crl	-
Cruciferae	<i>Brassica campestris</i>	-	-
	<i>Raphanus satuvus</i>	-	-

nl : necrotic local

nrl : necrotic ring local

cl : chlorotic local

crl : chlorotic ring local

vc : vein clearing

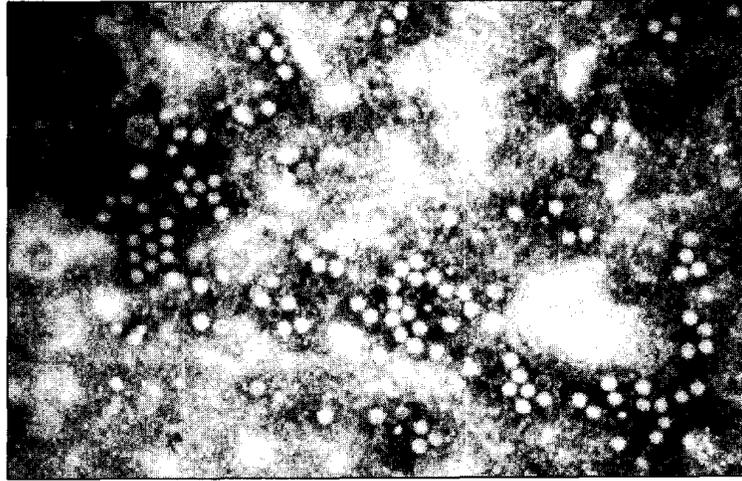
sm(≡m) : mosaic

2) 전자현미경 검정

역염색법(Negative staining)과 ISEM-test를 사용하여 병징이 나온 식물의 이병잎을 전자현미경을 통하여 조사한 결과 모든 이병잎에서 30-35nm의 구형을 관찰 할 수 있었다(그림2). 초박절편법(ultrathin section)에서는 *N. glutinosa*의 이병조직에서는 도관부에서만 구형 바이러스에 둘러싸인 봉입체를 관찰 할 수 있었다(그림3).

항원과 항체반응 즉 혈청반응을 전자현미경으로 관찰하는 ISEM방법의 관찰은 반응의 민감도가 매우 높으며 바이러스의 형태와 항원 항체 반응을 동시에 관찰할 수 있는 장점이 있다. 항체가 처리된 그리드에 항원액을 처리하고 씻어낸 다음, 다시 그 위에 항체를 처리하여 항체과잉조건을 만들어 주면, 바이러스 입자 주변이 항체로 더욱 뚜렷하게 장식될 뿐만 아니라, 그리드 위에 있는 저농도 바이러스입자의 유실을 방지할 수도 있다. 실제 항체가 처리된 그리드는 무처리 그리드에 비하여 LSV의 농도를 10^5 배 이상 증가 시켰다(박등, 1990). 그래서 이 방법은 시료수가 적은 조직배양용 모본 식물체에 대한 바이러스의 검정과 특이한 바이러스 및 계통의 동정 등 연구용진단에 가장 유용한 방법이다. 또한, 이 방법은 일반적으로 바이러스의 농도가 낮은 경우에는 ELISA보다 2배 이상의 민감도를 얻을 수 있다. 그러나, 단점은 이미 알려진 바이러스로 준비된 항체가 있어야 하는 것이다.

1)



2)

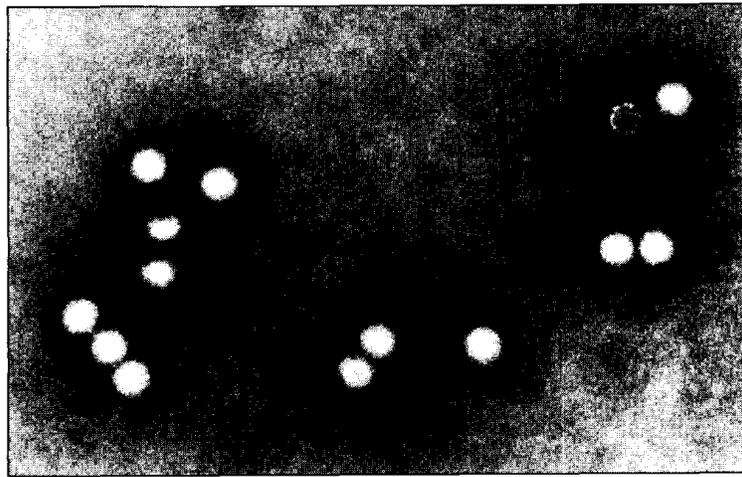
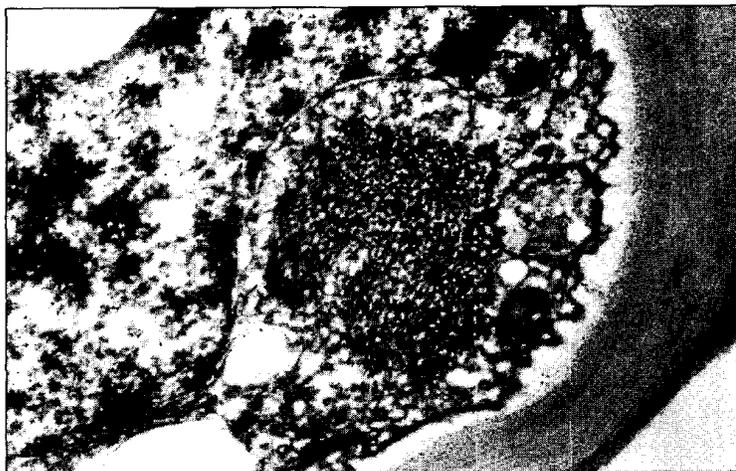


Figure 2. CarRSV inoculated *Physalis floridana* (1) and *Chenopodium quinoa* (2) (50,000 \times 2)

1)



2)

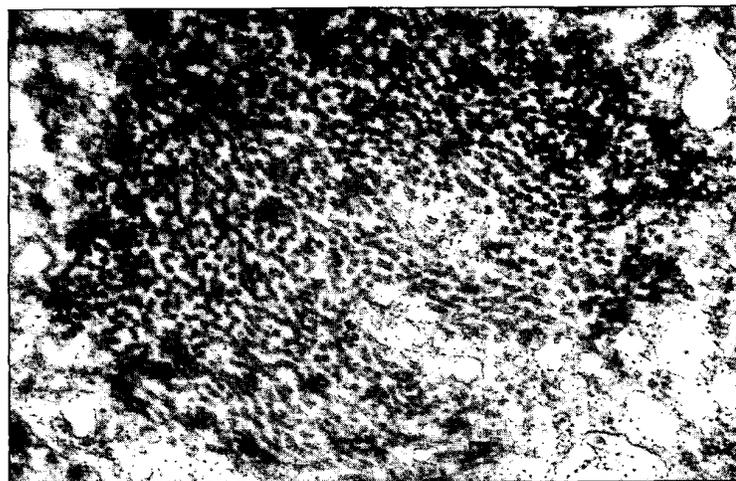


Figure 3. CarRSV inoculated *Nicotiana glutinosa*

1) 15,000 × 1.5

2) 50,000 × 1.5

3) 항혈청 검정

시료는 상엽에 전신감염을 나타낸 *Datura stramonium*, *Nicotiana benthamiana*, *Vigna unguiculata* 'Blackeye'와 접종엽에 국부감염을 나타낸 *Tetragonia expansa*, *Nicotiana benthamiana*를 사용하였다. CarRSV혈청검정을 한 결과 CarRSV로 동정하였고, 혈청검정시 *Nicotiana benthamiana*와 *Vigna sesquipedalis*의 상엽에서 침강선을 나타내는 좋은 결과를 볼 수 있었다(표 2).

Table 2. Results of agarose-gel diffusion

Indicator plant sap infected with CarRSV	(Position)	Reaction with CarRSV antiserum
<i>Tetragonia expansa</i>	(L)	-
<i>Datura stramonium</i>	(S)	+
<i>Nicotiana benthamiana</i>	(L)	+
<i>Nicotiana benthamiana</i>	(S)	+++
<i>Vigna unguiculata</i> 'Blackeye'	(S)	++

*(L) : Local symptom on the inoculated leaves

(S) : Systemic symptom on the upper leaves

-: no detection, +: delayed, ++: moderated, +++: severe

4) 바이러스분리주 증식

바이러스분리주 증식을 위해서 사용된 균주는 기주식물에 3차의 single local isolation을 거쳐 검정확인한 CarRSV strain을 사용하여 기주식물은 전신감염 기주인 *Vigna unguiculata* 'Blackeye'를 파종 후 약 3일이 지나면, peatmoss와 perlite를 혼합한 배양토를 사용한 비닐포트에 이식하였고, 약 3-4일이 경과되어 떡잎이 전개되었을 때, 건전한 유묘를 접종기주로 사용하였으며, 주/야 30/25℃가 유지되는 격리된 식물생장실에서 접종하여 재배하였고, 접종 후 이병식물에서의 채취시기는 접종 후 5-6일이 적당하였다. 총 3850종자를 채종하여, 54회 균주를 접종하여, 약 1.5kg을 수집하여 저온냉동고에 보관하여 접종재료로 사용하였다.

5) CarRSV 정제

Kassanis법(1985)을 변형하여 sucrose density gradient centrifugation을 하여 바이러스를 순화한 결과, 260nm에서 1.76mg/ml로써 약 1ml을 얻었다(그림 4, 5).

6) 정제 CarRSV의 Western blot분석

정제된 CarRSV와 이병익의 검정방법으로 western blot 검정을 하였다. 'SDS-PAGE Mighty Small II' gel 방법 (Pharmacia)을 사용하여 전기영동하고 western blot 한 결과 35kDa에서 분양받은 control인 CarRSV PV-0097 strain 과 동일하게 band가 확인이 되었다(그림6).

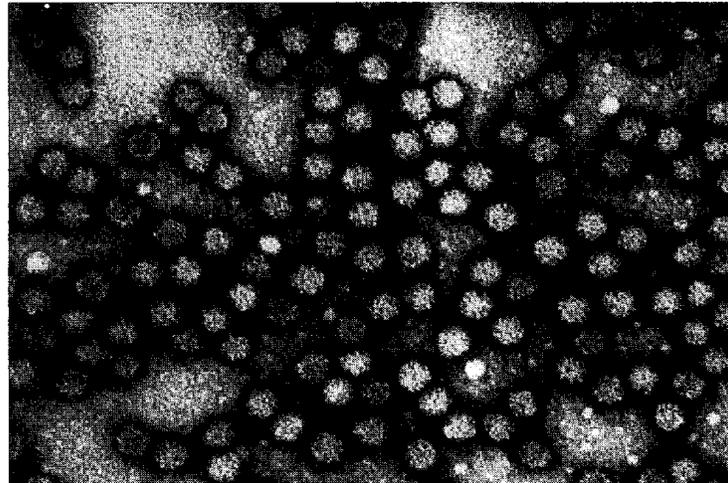


Figure 4. Electron microscopic observation after CarRSV purified (100,000×2)

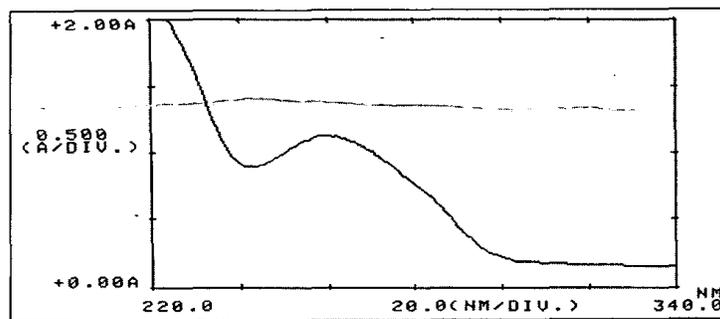
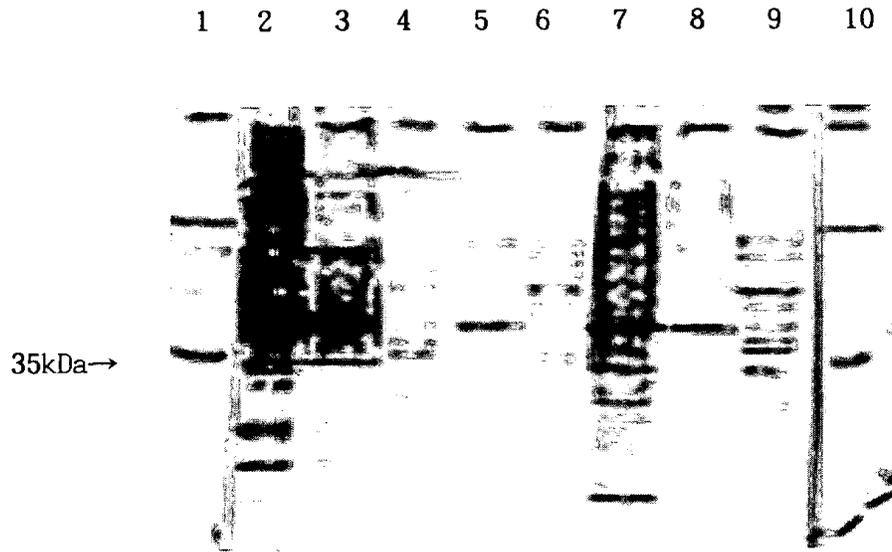


Figure 5. Spectrophotogram of CarRSV purified



- 1) Marker
- 2) Purified CarRSV 10 μ l
- 3) Purified CarRSV 1 μ l
- 4) Carnation control
- 5) *Vigna unguiculata* 'Blackeye' inoculated leaf
- 6) *Vigna unguiculata* 'Blackeye' control
- 7) CarRSV PV-0097 strain 10 μ l
- 8) CarRSV PV-0097 strain 1 μ l
- 9) *Nicotiana. clevendii* control
- 10) Marker

Figure 6. Western blot test of CarRSV purified

2. Virus Cp gene 분리 및 유전자조작

1) CarRSV Cp 유전자 Total ssRNA 추출

CarRSV genomic RNA는 375bp로 이루어져 있으며 4개의 major CarRSV cell-free translation products가 있다. Cp는 그 중 3번째 coding region에 해당 되는데 처음 ATG 개시 codon을 시작하여 1034 nucleotides로 이루어져 있다. 본실험에서 RT-PCR방법으로 CarRSV 계놈 RNA추출은, 정제CarRSV virus partical을 사용하여, Elise방법을 변형시킨 phenol extraction 방법, 즉 독일DMA연구소의 'Winter 방법'을 적용하여 분리한 결과, 20개의 colony 중에서 4개가 expected restriction pattern을 보였다. RT-PCR한 결과 기대했던 약 1.0kb DNA fragment가 정제된 CarRSV는 진하게 이병있는 연하게 얻어졌다(그림7).

2) RT-PCR을 이용한 CarRSV Cp cDNA 합성

CarRSV cp gene의 flanking region 과 identity를 가지는 25bp sequence로 구성된 oligomer를 사용하여 얻어진 RT-PCR product는 agrose gel에 전기영동하여 1kb에서 CarRSV Cp gene이 증폭된 것이 확인되었다(그림8).

3) CarRSV Cp gene cloning

PCR에 의해 amplified된 CarRSV-CP gene은 pUC19 vector에 ligation하였다. 새로 합성한 pUC-CarRSV-CP vector는 *E. coli* DH5α 에 transformation 하였다. 10개의 colony중에서 4개가 expected restriction pattern을 보였다 pUC19-CarRSV-CP의 gene, Dual 35S promotor와 TEV leader sequence, termination sequence를 포함하는 2.7kb fragment를 BamHI/EcoRI restriction enzyme site로 ligation시켰다. BamHI/EcoRI cut된 pUC-CarRSV-CP는 역시 BamHI/EcoRI cut된 pBin19 binary vector에 ligation 시킨, pBin-CarRSV-CP는 DH5α *E. coli* host cell에 transformation하여 생성된 약 50여개의 colony중에서 20개의 colony를 isolation하여 restriction enzyme site (BamHI/EcoRI) analysis하였다. 20개의 colony중에서 4개가 expected restriction pattern을 보였다.

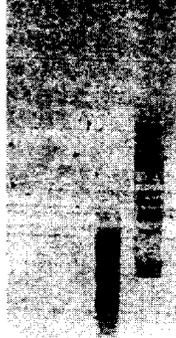


Figure 7. Preparing total ssRNA from Leaves and purified CarRSV
lane 1: Marker, lane 2: CarRSV, lane 3: Leaf CarRSV
lane 4: *Vigna unguiculata* 'Blackeye' control

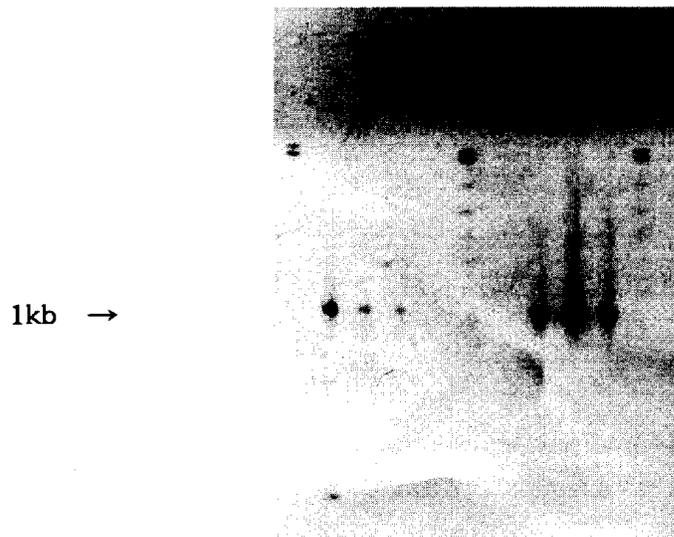


Figure 8. Synthesis of CarRSV Cp cDNA by RT-PCR analysis

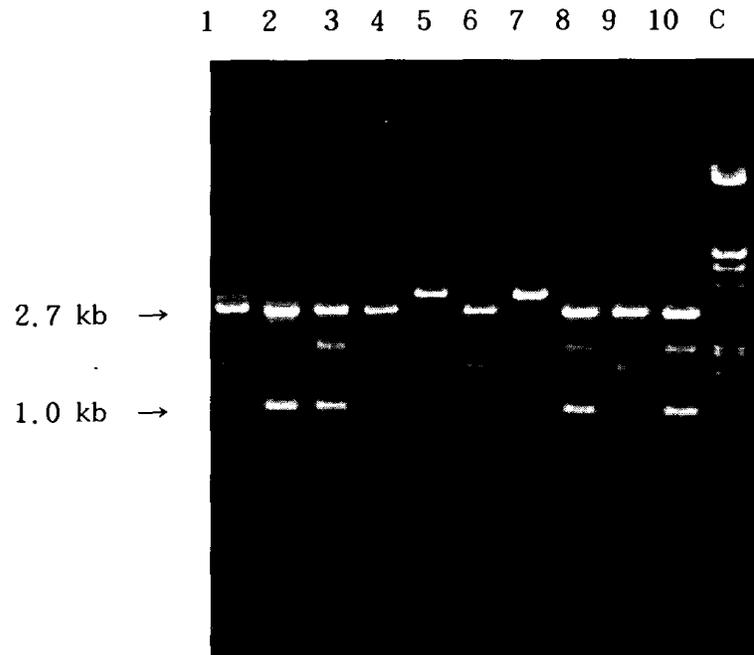


Figure 9. Restriction of *Bam*HI/*Eco*RI double digestion in CarRSV Cp gene clone

- 1) Lanes 2, 3, 8 and 10: positive
- 2) Lanes 1, 4, 5, 6, 7 and 9: negative
- 3) C: λ DNA/*Eco*RI+*Hind*III marker

4) CarRSV Cp gene의 plant expression vector 내로의 subcloing

4개의 colony에서 추출한 CarMV CP gene을 포함하는 pBin-CarRSV-CP DNA를 fresh *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 transformation하였다. Isolation 하여 restriction enzyme site (*Bam*HI/*Eco*RI)를 분석한 결과, CP fragment가 1.0 kb위치에 확인되었으며 4개의 transformant 중에서 2개가 7xpected CP gene을 포함하는 것으로 확인되었다(그림9). 이 CarRSV Cp gene construction을(그림9, 10) carnation 품종의 형질전환에 사용하였다.

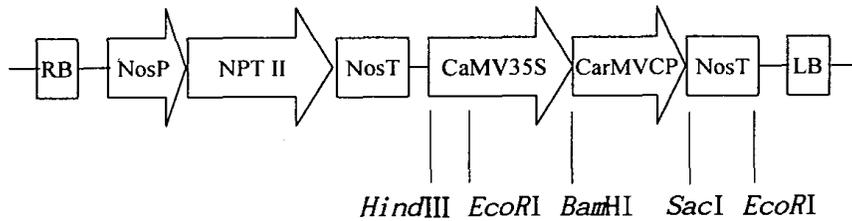


Figure 10-1. Construction of pCarMV Cp

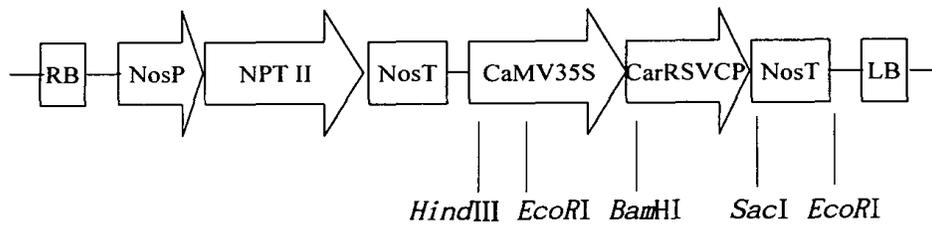


Figure 10-2. Construction of pCarRSV Cp

- NosP: nopaline synthase promoter,
- NPT II: neomycin phosphotransferase gene II,
- NosT: polyadenylation signal of the nopaline synthase gene
- CaMV35S: 35S promoter of cauliflower mosaic virus,
- CarMV Cp: Carnation Mottle Virus Coat Protein gene,
- CarRSV Cp: Carnation Ringspot Virus Coat Protein gene,
- RB : T-DNA right border,
- LB : T-DNA left border

3. 카네이션 조직배양 기술확립

재료품종 조직배양은 표3에서와 같이 3가지품종에서 잎절편 모두 27가지 조합 구에서 callus와 shoot가 형성되었다. 'Kuimel Rose'는 NAA 0.1~1.5mg/l와 BAP 0.5~1.0mg/l, 'Splash'는 NAA 0.1~0.25mg/l와 BAP 0.25~1.0mg/l, 'Hirodandy'는 NAA 0.1~0.25mg/l와 BAP 0.5~1.0mg/l에서 shoot형성이 잘 되어서 품종간 차이가 보였으며, 전체적으로 NAA는 0.1~0.25mg/l, BAP는 0.5~3.0mg/l로 NAA농도보다 BAP의 농도요구도가 높음을 알 수 있었다. 표 4에서 부위별 shoot재분화율을 살펴보면, 'Hirodandy'의 절편체당 shoot형성수는 잎은 1.14, 줄기는 0.74로 잎이 줄기보다 높았다. 생존율은 잎은 414절편을 접종하여 4주째 473개의 shoot가 생겼으며, 12주일때 282식물개체가 생존하여 54%의 생존율을 나타내었고, 줄기는 155절편을 접종하여 4주째 65개의 shoot가 생겨서, 12주일때는 34식물개체가 생존하여 39%의 생존율을 보였다. Tasy는 1/2 MS기본배지에 3% sucrose, 0.9% Agar, BAP 0.5mg/l의 조건하에서 shoot의 다량증식과 묘의 투명화현상을 감소시키는데 효과적이라고 하였다.

Table 3. Effects of NAA and BAP combinations on shoot induction and organogenesis from *Dianthus caryophyllus* L. three cultivars.

BAP		0.25	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
NAA(mg/l)							
cv.							
0.1	'KM'	CS	CS ^{***}	CS [*]	CS [*]		CS
	'SL'	CS ^{***}	CS ^{**}	CS ^{**}	CS [*]	CS	CS
	'HD'	CS [*]	CS ^{**}	CS ^{***}	CS [*]		CS
0.25	'KM'	CS [*]	CS ^{**}	CS ^{***}	CS ^{**}	CS	CS
	'SL'	CS ^{***}	CS ^{**}	CS ^{***}	CS [*]	CS	CS
	'HD'	CS [*]	CS ^{***}	CS ^{**}	CS		CS
0.5	'KM'		CS ^{**}	CS ^{**}	CS [*]	CS	CS
	'SL'	CS	CS ^{**}	CS ^{**}	CS ^{***}	CS ^{**}	CS
	'HD'		CS ^{**}	CS [*]	CS [*]	CS [*]	CS [*]
1.0	'KM'	CS	CS	CS ^{***}	CS [*]	CS ^{***}	CS
	'SL'	CS	C	CS [*]	CS [*]	CS	CS [*]
	'HD'		CS	CS [*]	CS	CS	CS
1.5	'KM'	CS ^{**}	CS ^{**}	CS ^{***}	CS [*]	CS ^{***}	CS
	'SL'	CS	CS ^{**}	CS [*]	CS	CS [*]	CS [*]
	'HD'		CS ^{**}		CS	CS	CS
2.0	'KM'	CS	CS	CS	CS	CS	CS [*]
	'SL'	CS	CS [*]	CS	CS	CS	CS

cv.: Cultivar, 'KM': 'Kuimel Rose', 'SL': 'Splash', 'HD': 'Hirodandy'
 C: Callus, CS: Callus+Shoots
 Shoot formation: ***very good, **good, *morderate

Table 4. Extent of the regeneration for *Dianthus caryophyllus* L. 'Hirodandy

Ex.	No. of the combined	No. of the explanted	No. of shoots formed	No. of viableplant		
				b/a(per explant)	12 (c)	c/b (%)
		(a)	(b)			
ML	57	414	473	1.14	282	54
Pet	31	155	65	0.74	34	38

Ex: Explant, ML: Microleaves, Pet: Petiole

4. Carnation Virus Cp 유전자 형질전환

1) Carnation 품종에 pGA 482 형질전환체 개발

Carnation 'KM', 'SL', VG' 품종에 pGA482를 형질전환한 결과, 선발중 4-5주에 많은 개체가 백화하여 고사하며, pGA482의 NPT II gene은 818절편을 접종하여, 8주에는 52개체에서 shoot가 형성되었고, 현재 22개체가 생존하고 있으며, 'SL'은 74절편을 접종하여, 8주에는 2개체에서 shoot가 형성되었고, 현재 2개체가 생존하고 있고, 화색형질전환에 사용한 품종 'VG'은 538절편을 접종하여, 8주에는 3개체에서 shoot가 형성되었고, 현재 3개체가 생존하고 있다(표5).

Table 5. Extent of the transformation ratio of *Dianthus caryophyllus* L. cocultivated with pGA482.

No. of explant cocultivated(a)	Kanamycin week								b/a (%)	Transformant plant (month)		
	1	2	3	4	5	6	7	8		1	4	
	'KM'	818	325	339	318	230	179	119	52	52	6.2	34
'SL'	74	27	27	23	19	9	3	2	2	2.7	2	2
'VG'	538	538	187	142	74	41	18	15	8	1.5		3

2) Carnation 품종에 CarMV Cp gene 형질전환체 개발

선발중 4-5주에 많은 개체가 백화하여 고사하며, pGA Cp gene은 3품종에서 총3952절편체를 접종하여, 8주에는 126절편체에서 shoot가 형성되었고(그림 11), 현재 93개체가 생존하고 있고(표6), 비닐포트에 3개체, 화분에 4개체가 재배되고 있다(그림18, 19).

Table 6. Extent of the transformation ratio of *Dianthus caryophyllus* L. cocultivated with pCarMV Cp.

No. of explant cocultivated(a)		Kanamycin								b/a (b) (%)	Transformant plant (month)	
		week									1	4
		1	2	3	4	5	6	7	8			
'KM'	2002	1010	912	741	554	305	152	89	83	4.1	63	53
'SL'	1752	805	705	581	414	240	100	49	36	2.1	33	33
'HD'	198	53	55	39	33	17	11	9	7	3.5	7	7
Σ	3952	1868	1672	1361	1021	562	263	147	126	3.2	106	93

3) Carnation 품종에 CarRSV Cp gene 형질전환체 개발

CarMV와 같은 방법으로 형질전환하였으며 그 결과, 선발중 4-5주에 많은 개체가 백화하여 고사하며, CarRSV Cp gene은 'HD' 품종에서 163절편체를 접종하여, 8주에는 7절편체에서 shoot가 형성되었고, 현재 7개체가 *in vitro*에 생존하고 있다(표7).

Table 7. Extent of the transformation ratio of *Dianthus caryophyllus* L. cocultivated with CarRSV Cp.

cv. No. of explant cocultivated(a)		Kanamycin								b/a (b) (%)	Transformant plant (month)	
		week									1	4
		1	2	3	4	5	6	7	8			
'HD'	163	64	64	59	32	28	10	10	7	4.2	7	7

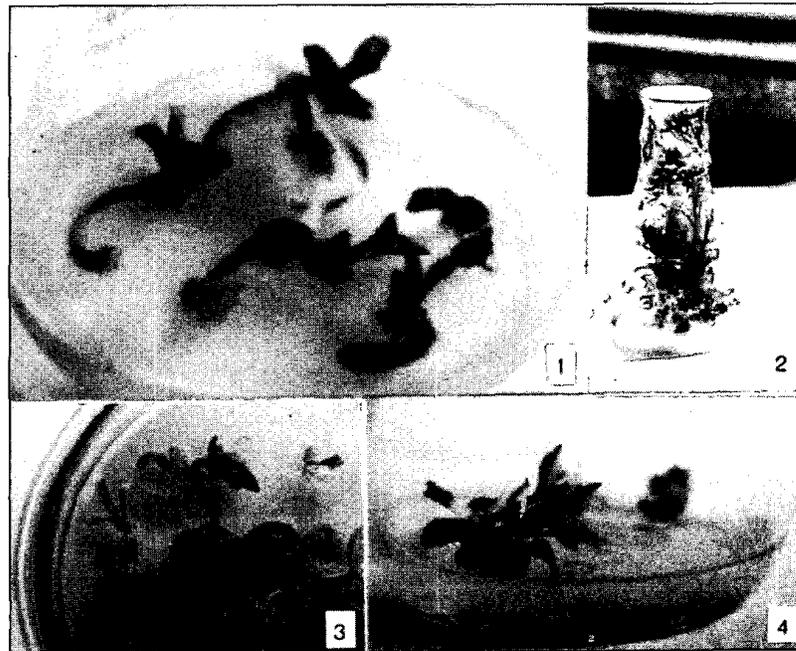


Figure 11. Regenerated plants in tissue culture and transformation of *Dianthus caryophyllus* L. 'Hirodandy' and 'Virginie'.

- 1),2) Plantlets regenerated from leaf-derived callus of 'Hirodandy' after 3 weeks (1) and 8 weeks culture (2).
- 3),4) Transgenic plant from kanamycin resistant callus of 'Virginie' after 5 weeks (3) and 13 weeks cocultivation (4).

5. 형질전환체 검정

1) pGA482 기내형질전환체의 NPT II gene 검정

(1)형질전환체 DNA 추출

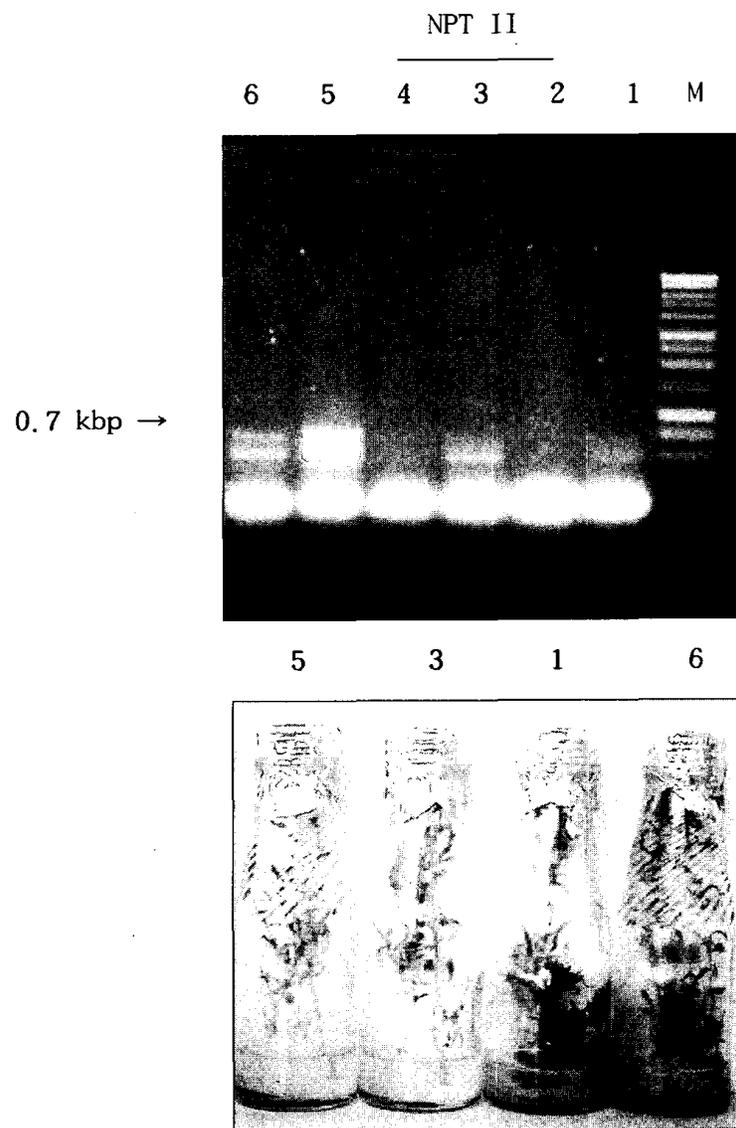
기내형질전환체에서 채취한 잎을 액체질소로 동결시킨 시료 50mg을 사용하여 genomic DNA를 추출하였다.

(2)NPT II gene의 PCR 분석

8주동안 Kanamycin선발배지에서 선발된 형질전환개체에서, binary vector pGA482의 reporter gene인 NPT II의 발현을 확인하기 위하여, PCR 분석을 하였다. 그결과 16개체중 약 0.7Kbp 위치에서 강한 band가 8개체, 약한 band가 3개체에서 관찰되었다(그림12, 13). 따라서 reporter gene인 NPT II gene이 발현되었다는 것을 알 수 있었다.

(3)NPT II gene의 Southern Blot 분석

PCR결과에서 positive한 형질전환체를 Southern hybridization으로 *npt II* gene의 유무를 확인하였다. Molecular probe는 *npt II* 를 encoding 하고 있는 DNA를 (pGA482) *Bam*HI/*Hind*III digestion(2 kbp)하여 얻었다. 약 13.2 kbp 에서 관찰되어 *npt II* gene이 확인되었다(그림14).



lane 1, 3, 5, 6 : Transgenic plant
 lane 2, 4 : Kanamycin resistant plants

Figure 12. PCR analysis of total DNA isolated from putative transgenic *Dianthus caryophyllus*

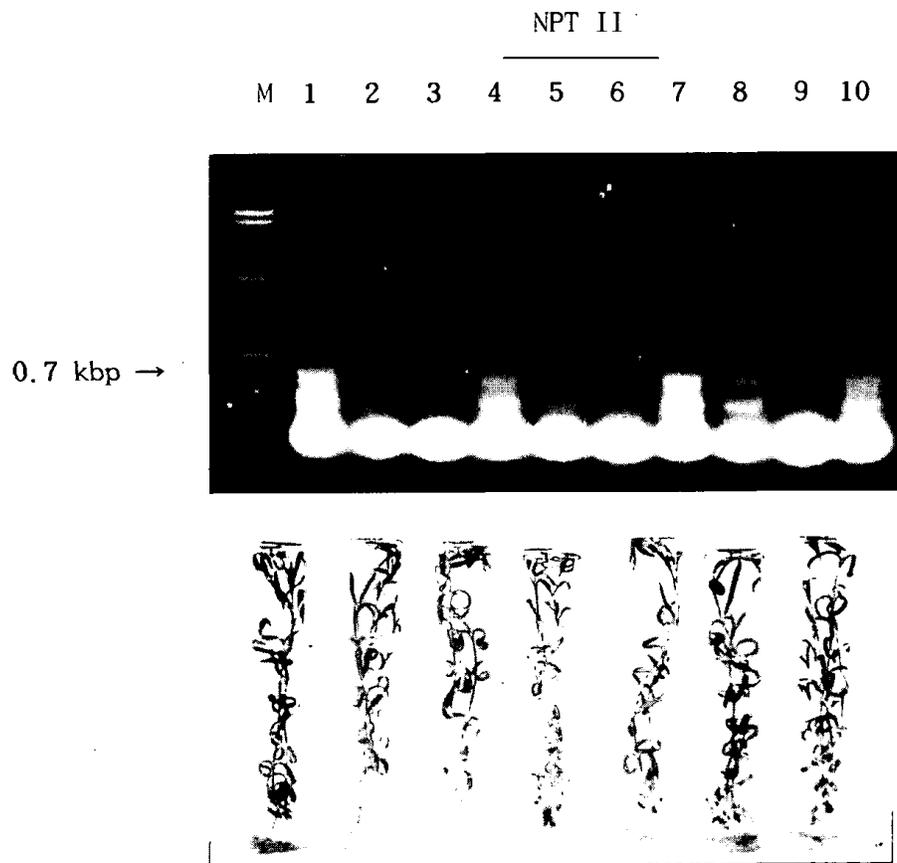
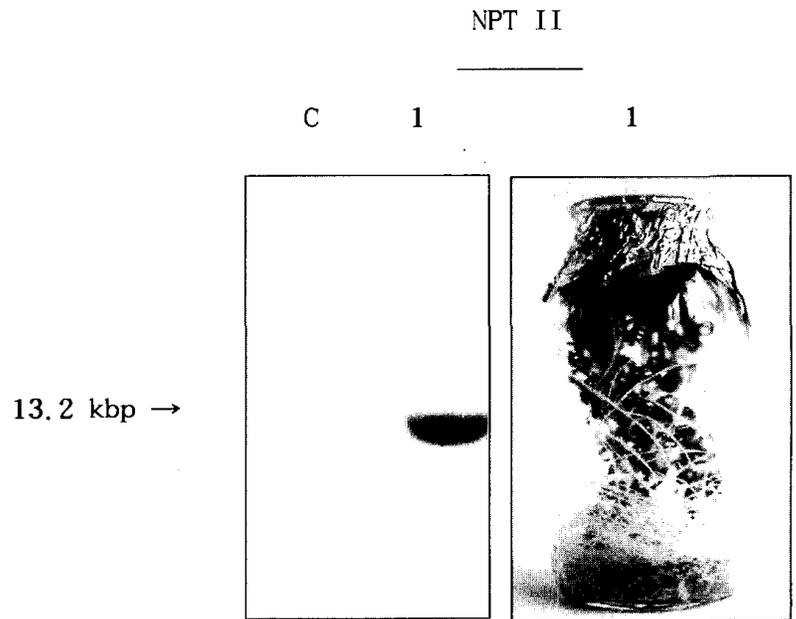


Figure 13. PCR analysis of total DNA isolated from putative transgenic *Dianthus caryophyllus*



C : Nontransgenic control plant
 lane 1 : Transgenic plant

Figure 14. Southern analysis of total DNA isolated from transgenic *Dianthus caryophyllus* L.

2) Carnation 품종에 CarMV Cp gene의 형질전환체 검정

(1) CarMV Cp gene PCR분석

Kanamycin배지에서 선발된 형질전환체를 PCR으로 형질전환체의 pGA Cp gene의 발현을 분석한 결과, 8주동안 Kanamycin선발배지에서 선발된 형질전환개체에서 pGA Cp gene이 발현되었는지를 PCR로 확인한 결과, 약 1.1Kbp 위치에서 34개체가 강한 band로 관찰되었다(그림15). 이로써 Cp gene이 식물체 내에서 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

(2) pGA Cp gene의 Southern Blot 분석

PCR결과에서 positive한 형질전환체를 Southern hybridization으로 Cp gene의 유무를 확인하였다. Molecular probe는 Cp gene 를 encoding하고 있는 DNA를 (pGA Cp) *Bam*HI/*Hind*III digestion하여 얻었다. 약 1.1 kbp 에서 관찰되어 Cp gene이 확인되었다(그림16).

(3) pGA Cp gene의 western blot 검정

형질전환 카네이션식물체의 조직에 CarMV Cp가 전사 및 단백질로 번역되었는지 여부를 조사하기 위하여, 형질전환된 카네이션을 바이러스에 노출되지 않도록 유지재배하여, 단백질을 추출하고, 'SDS-PAGE Mighty Small II' gel 방법 (Pharmacia)을 사용하여 전기영동하고, western blot을 실시한 결과, 대조구인 정제된 CarMV, CarMV 접종 후 이병된 *Chenopodium quinoa*와 kanamycin 선발 형질전환개체의 앞에서 모두 35kDa 에서 동일하게 band가 확인되었다(그림17). 그리고 'HD' 품종의 형질전환개체에서도 35kDa크기에서 발현되었다(그림17). 이로써 CarMV Cp유전자가 단백질로 35kDa에서 발현되었음이 확인되었다.

3) CarRSV Cp gene 기내형질전환체 증식

CarRSV Cp 형질전환개체들은 아직 약하므로, 차후 *in vitro* 에서 더 증식시켜, 유전 분석과 포트이식을 할 계획이다.

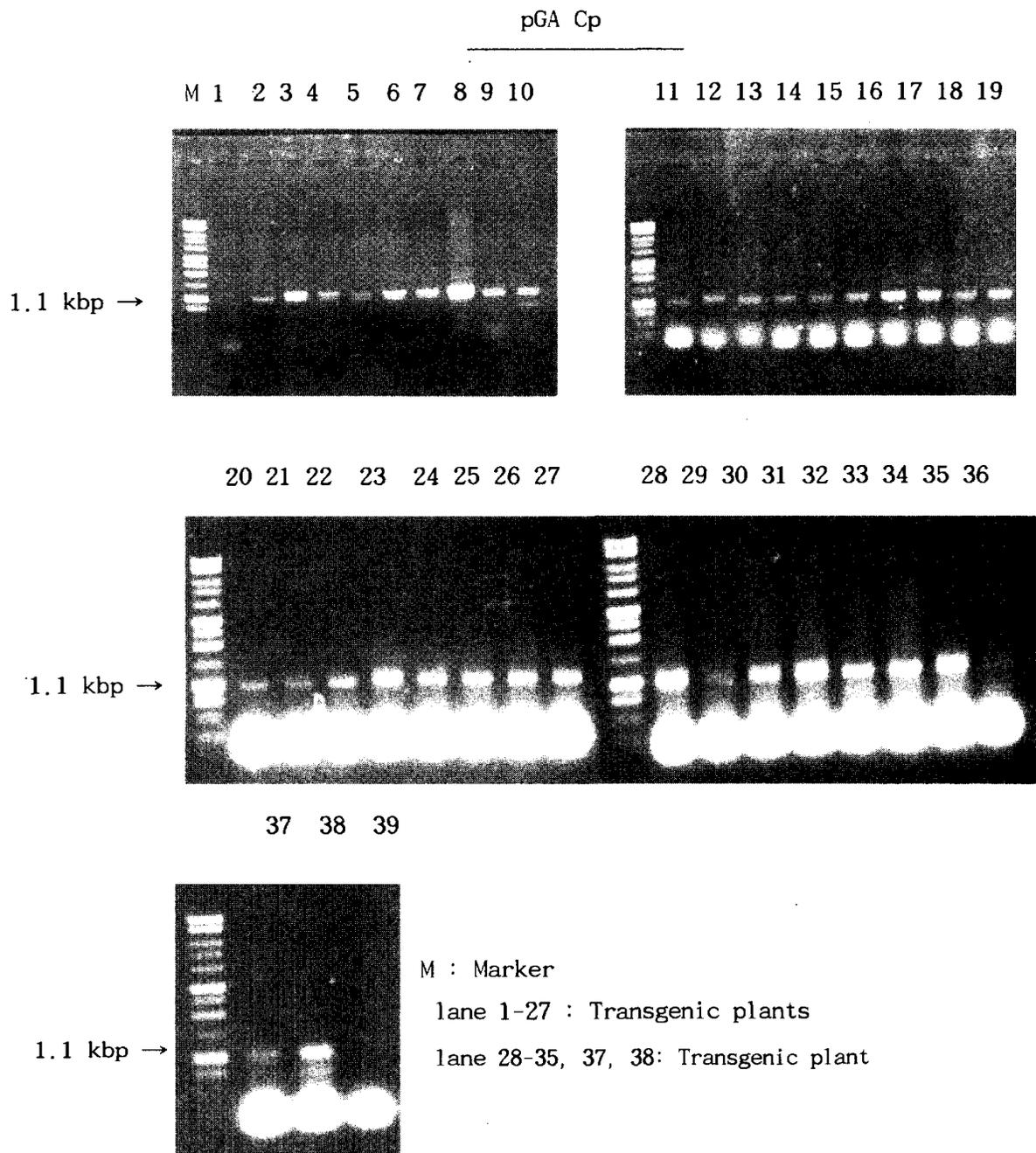
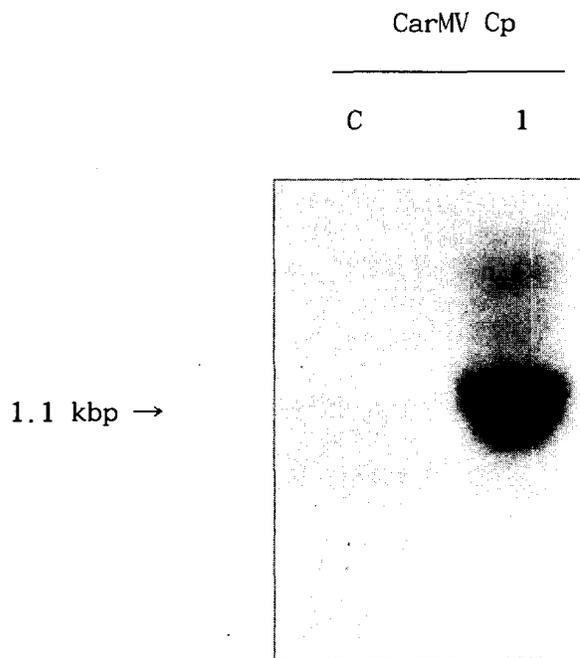


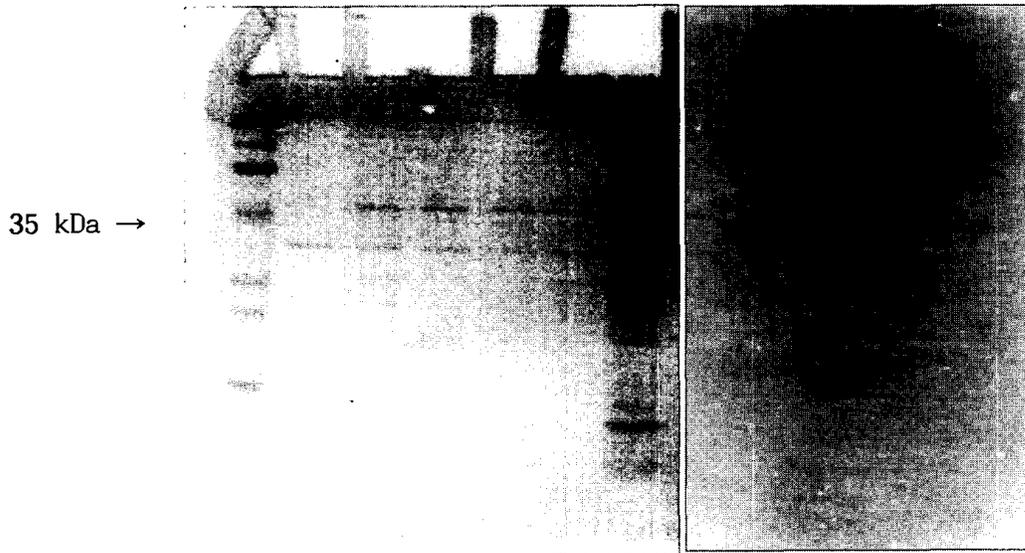
Figure 15. PCR analysis of total DNA isolated from putative transgenic *Dianthus caryophyllus* L.



C : Nontransgenic control plant
lane 1 : Transgenic plant

Figure 16. Southern analysis of total DNA isolated from transgenic *Dianthus caryophyllus* L.

	transgenic Plant**CarMV				transgenic Plant	
	*purified ----- PV0245					
	CarMV	'SL'	'KM'	inocu.	'HD'	negative
	diluted	-----	-----	'C. q.'	-----	control
M ×1/100	1	2	3	4	5	6
				p.C.		



*purified CarMV diluted to 1/100

**CarMV-PV0245 inoculated *Chenopodium quinoa*; positive Control

'SL'; 'Splash', 'KM'; 'Kumelrose', 'HD'; Hirodandy

Figure 17. Western blot analysis of leaves proteins from of putative transgenic Carnation plants by kanamycin selection



Figure 18. Regenerated plants in transformation pCarMV Cp of *Dianthus caryophyllus* L. 'Kumel Rose'(1) and 'Splash'(2)

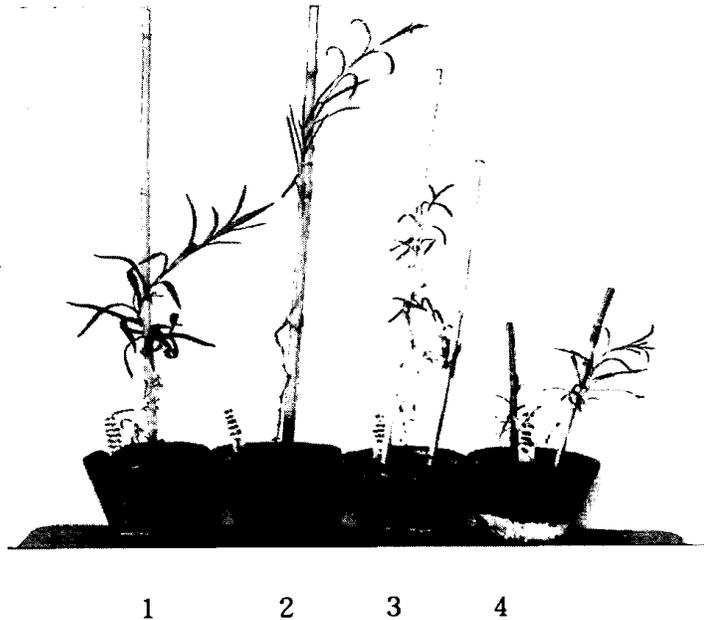


Figure 19. Regenerated plants in transformation of pCarMV Cp *Dianthus caryophyllus* L. 'Kumel Rose'(1, 2) and 'Splash'(3, 4)

6. 조기강건 형질전환체 생산을 위한 발근배지 개선

형질전환체의 kanamycin 선발후의 생존율과, 발근후의 포트생존율을 높이기 위하여, MS기본배지에서 무기염류, vitamin, sucrose와 Agar의 농도를 달리하여 기내 강건묘육성을 위한 실험결과, sucrose는 3%가 5%보다 생육이 좋으며, 무기염류는 1이 ½보다 좋았고, 비타민은 전체와 일부간에는 차이가 없었다(표8, 그림20). 이는 무기염류 전체와 sucrose 20g/l 첨가배지에서 신초의 발육이 더 좋았다는 결과와 같은 경향이다(조 등, 1999).

Table 8. Effects of various MS-Medium on growth from shoot tip culture in carnation 'Splash'.

	No. of leaves ^{z)} (a)	Plant length(cm) ^{y)} (b)	(a/b)
Vitamin 전체	96	50.0	1.92
Vitamin 일부	94	51.5	1.83
Agar 0.8%	80	42.5	1.88
Agar 1.2%	110	59.0	1.86
Macro solution 1	104	61.0	1.71
Macro solution 1/2	86	46.5	2.12
Sucrose 3%	100	65.5	1.53
Sucrose 5%	90	36.0	2.50

z), y): after 4 weeks in culture

7. 형질전환식물체 순화 및 온실재배

강건묘배지와 발근배지에서 발근이 잘된 형질전환체는 지피포트에 이식한 후 4주 가량 성장상에서 순화시킨 후, 화분으로 이식하여 재배한다. 178 *in vitro* 형질전환중식개체를 화분으로 이식하여, 현재 10%정도의 생존율을 보이고 있다.

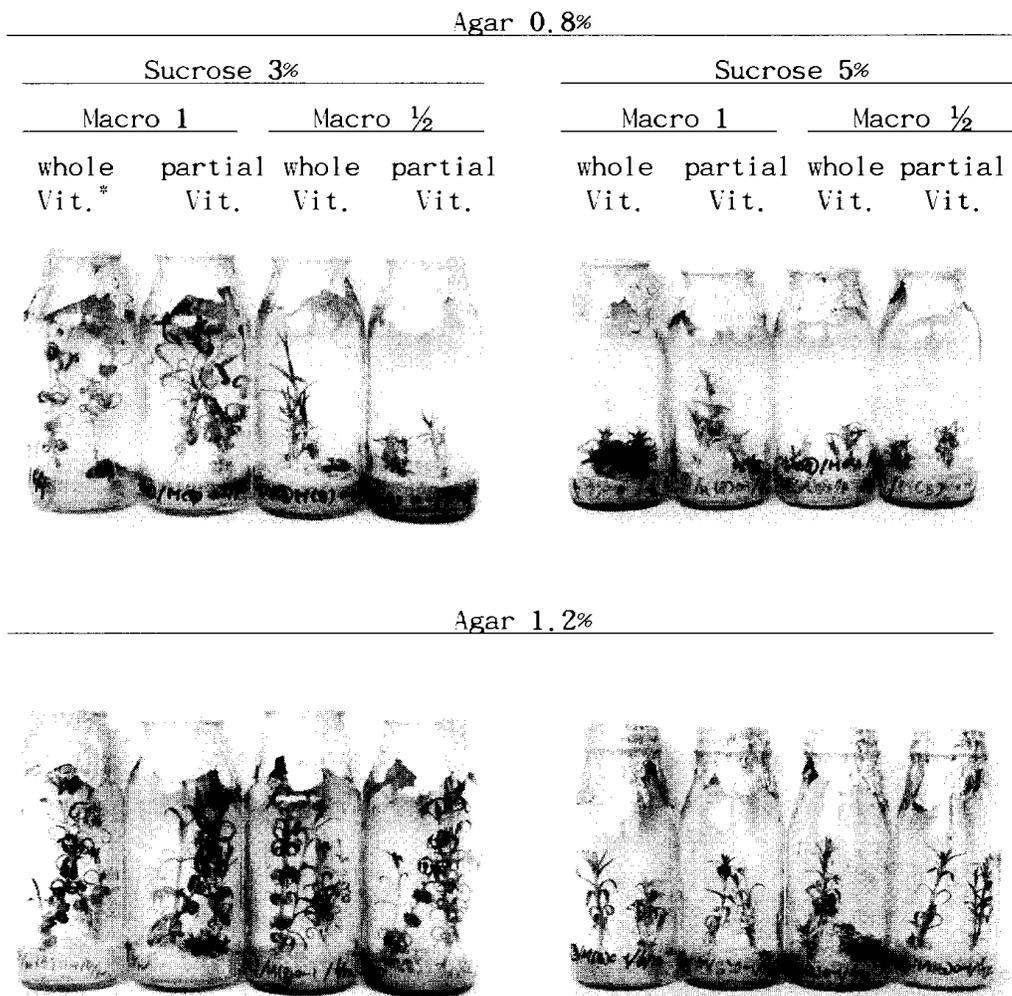


Figure 20. Effects of various MS-Medium on growth from shoot tip culture in carnation 'Splash'.

Vit.*: vitamins

제 3 장 화색조절 분자유종

제 1 절 서 론

카네이션은 전 세계적으로 장미, 국화와 더불어 3대 절화용 화훼작물로서, 품종이 많고, 화색, 겹꽃, 꽃크기 등이 매우 다양하며, 사계성으로 연중 감상할 수 있어, 많은 사람들에게 애호받고 있다. 카네이션 절화의 시설재배 면적과 생산량이 꾸준히 증가하며, 절화용 화훼류에 대한 대중의 기호도는 화색, 화형 등에서, 지속적인 다양한 변화가 요구되므로, 분자유종에 의한 변이의 창성이 요구된다.

최근 분자유전학의 발전으로, 화색을 원하는 유형으로 변화시키는 것이 가능한 'Molecular Flower Breeding'에 많은 관심이 모이고 있다. 많은 화훼작물에서 분자유전학적 기술을 이용하여, Flavonoid 생합성대사경로에 관여하는 여러 효소들을 만드는 유전자가 분리·분석되었고, 이를 응용하여 꽃의 화색을 변화시키기 위한 형질전환의 시도는, 옥수수 Dihydroflavonol 4-reductase (DFR) 유전자를 페튜니아에 도입하여, 적벽돌색의 새로운 화색의 페튜니아를 육성(Meyer et al, 1987)한 것을 시발점으로, 여러 화훼작물에서 색소유전자(sense)의 도입을 통한 화색변이 유도, antisense gene을 이용해 화색생합성대사를 저해하여 꽃색을 없애는 등, 다양한 새로운 화색발현을 유도할 수 있는 가능성이 열렸다.

형질전환을 통한 화색육종의 전제조건은, 교잡육종에 의한 색소유전자의 식물체내로의 전이를 통한 화색의 변화와는 달리, 화색생합성대사경로를 밝혀, anthocyanidin 생성 색소유전자중에서, 효소활성이 결여된 mutant (recessive allele) gene을 갖는 inbreed line을 찾고, 어떤 대사경로에 목적화색유전자를 도입할 것인지 결정하여야 한다. 그리고 색소조절유전인자를 분리, 분석하고, 목적유전자를 plant expression vector로 subcloning 한 후, 형질전환을 하여, 새로운 화색유전자를 도입 발현시킴으로써, 자연상태에 존재하지 않는 화색육성이 가능하게 된다.

상업적으로 팔리고 있는 카네이션의 화색은 주로 흰색, 노란색, 오렌지색과 여러종류의 붉은색이다. 그러나 불완전한 발현에 의해서 흰색, 노란색, 옅은색깔의 배경에 줄무늬, 반점등을 나타내는 것도 있다. Carnation 화색은 주로 Flavonoid와 Chalcone유도체의 생합성대사에 의해서 좌우되는데, 그들의 최종산물은 Pelargonidin (Pg), Cyanidin (Cy), Kaempferl (Km), Quercetin (Qu)이다. 그러나 노란색과 오렌지색깔의 최종산물은 Isosalipurposide이다.

카네이션에서 DFR 효소는, DHK 기질을 촉매하여, Leucopelargonidin (LPg)을 생성하며, gene A에 의해서 조절된다. Recessive allele의 경우는 acyanic flower가 되며, DFR가 불완전하면 흰바탕에 붉은색 줄무늬 등이 생긴다.

카네이션 화색에 관여하는 유전자의 발현을 phenotype으로 가정한 것은, 1947년 (Mehlquist & Geissmann)에서 부터 이루어졌으며, 1992년 (Stich et al)에 'Virginie' ('VG')품종은 유전적, 생화학적으로 anthocyanidin 생합성대사경로가 밝혀진 품종이다. DFR-mutant인 'VG'품종은 DHK산물은 생성하나, gene A와 R가 recessive allele의 경우로써, 꽃색이 흰색이다. 왜냐하면 'VG'는 aa와 rr가 loci에서 recessive alleles로써, DFR와 F3'H의 활성이 없다. Gene A의 recessive alleles (aa)는 Dihydroflavonols DHK와 Leucoanthocyanidins LCy 사이의 생합성대사를 방해하고, Gene R의 recessive alleles (rr)은 DHK와 dihydroquercetin (DHQ) 사이의 생합성대사를 방해한다.

본 연구는 carnation mutant 'VG'백색품종에 'DS'적색품종의 A gene (DFR생합성 유전자)를 유전자조작한 다음, 'VG'품종에 형질전환하여, DHK기질을 촉매하여 Leucopelargonidin Biosynthesis를 유도하는 한편, DFR antisense 유전자를 'TG'품종에 도입하여, DFR불활성을 유도하여, DHK기질의 사용을 억제시켜, 적색변이 화색육성을 유도하여, 고품질카네이션 육성을 위한, 화색분자육종기술방법의 체계확립을 하고자 하였다. 카네이션의 재료품종의 유전분석을 위한, Flavonoid 생합성대사경로는, 본인과 국제공동연구자인 독일의 Forkmann교수연구실에서 수행하였으며, 본 연구팀에서 분자레벨에서의 gene manipulation과, 상당히 앞서가고 있는 형질전환기술을 적용하여 화색분자육종의 실용화단계에 접근을 시도하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 재료식물 수집

본 실험에서 사용한 carnation은, 1947년 화색발현에 관여하는 3개의 기본적인 유전자 Y, I, A 를 표현형의 분리비로 밝혔으며(Gaissman & Mehlquist), 그 후 1980년 생리생화학적 검정을 통하여 유전자 한개가 CHI의 활성화에 관여한다는 사실을 보고하였고(Forkmann & Dangelmayr), 1992년 유전자 A 의 역할이 DFR 와 관계함(Stich et al.)을 증명하였다. 이 inbreed line을 독일에서 분양받았다. Carnation inbreed line은 대구가톨릭대학교의 온실과 노지에서 재배하였으며, 꽃은 각 개화단계별로 수확하여 바로 액체질소로 냉동 후 -70℃에 저장하여, 필요에 따라 사용하였다.

2. DFR 유전자분리 및 유전자조작

1) *Dianthus caryophyllus* L. 의 꽃잎으로부터 cDNA library의 합성

10g의 carnation품종인 'Desio'의 꽃봉오리를, 액체질소를 첨가한 막자사발로 분쇄한 후, guanidium chloride방법을 사용하여, total RNA를 분리한 후, 230, 260, 280nm에서 spectrophotometer를 사용해서, 서로 다른 파장을 확인하였다. 1차 oligo-dt cellulose coloum을 통하여 mRNA를 얻고, 2차 coloum을 통과 한 후 순수한 mRNA를 분리하였다. 이중 일부의 mRNA를 cRNA library 합성에 사용하였다.

2) 국내 카네이션 화색 DFR생합성유전자의 screening

'Desio'꽃에서 합성된 cDNA library로부터 옥수수의 DFR유전자인 A₁유전자를 probe로 사용하여 screening하였다.

3) DFR유전자의 염기서열 분석

분리한 6개의 DFR유전자를 각각 plasmid pUC19 cloning하여 염기서열 분석을 수행하였다.

4) DFR유전자의 G/C 함량 분석

분리한 carnation의 DFR cDNA의 coding region의 염기배열을 분석하여 G 와 C의 함량을 조사하였다.

5) *in vitro* transcription과 translation

분리한 유전자의 발현을 증명하기 위하여 먼저 유전자를 Bluescript KS' vector에 sense와 antisense방향으로 cloning 한후, T7-RNA-Polymerase 와 T3-RNA-Polymerase를 이용하여 transcription 시키고, 생성된 mRNA를 다시 reticulocyte system과 [35S]-Methionin labelling을 이용하여, translation 을 유도한 후, 생성된 protein을 SDS-PAGE를 통해 확인하였다.

6) 재료식물의 DFR 유전자 Northern Blot 분석확인

카네이션에서 유전적, 생화학적으로 알려져 있는, 2개의 품종 즉 'Tanga'('TG'), 'Virginie'('VG')를 확인하기 위하여, 앞의 실험에서 분리한 carnation의 DFR유전자를 probe로 Northern blot 분석을 수행하였다.

7) DFR gene의 plant expression vector내로의 subcloning

pUC19에 cloning 된 DFR 유전자를 *EcoRI* 으로 partial digestion하여, 1.2kb 의 band를 elution한 후, binary vector 인 pGA748의 multiple cloning site 의 *EcoRI* site에 연결하였다.

3. 재료식물체 재분화

재료식물 'Virginie' ('VG'), 'Desio' ('DS') 품종을 *in vitro* 상태에서 MS기본 배지에 계대배양하여 4~8주된 무병주에서 잎과 줄기를 채취하여 접종에 사용하였다. 조직배양배지는 MS기본배지에 NAA (α -Naphthalene acetic acid)를 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5mg/l, BAP (6-Benzylaminopurine) 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0mg/l의 조합과 농도를 27가지로 달리하였고, sucrose 30g/l, pH 5.7, agar 8g/l를 첨가한 고체배지를 121°C, 1.4bar에서 15분간 고압증기 멸균소독 한 후 사용하였다. 배양환경은 24±2°C, 1,100~1,450 lux 아래에서 16시간 명과 8시간 암상태로 4주간 배양하여 조사하였다.

4. DFR 형질전환체 개발

사용균주는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 strain을 host strain으로 하고, 형질전환식물체를 선별할 수 있는 표지유전자로 kanamycin으로 선발된 NPT II (neomycin phosphotransferase) gene이 삽입된 binary vector pGA482와 pGA748/DFR를, 항생제 rifampicin 100mg/l, streptomycin 100mg/l, tetracycline 12.5mg/l, kanamycin 50mg/l가 첨가된 YEP (Bacto-peptone 10g/l, Bacto-yeast extract 10g/l, NaCl 5g/l, Bacto-agar 15g/l, pH 7.0) 고체배지에서 28°C, 암상태로 배양하여 형성된 single colony를 접종봉으로 취한 후, 동일항생제를 첨가한 YEP액체배지에서 28°C, 150rpm 으로 24~36시간 현탁배양하여 형질전환에 사용하였다.

형질전환체의 kanamycin선발은 무균묘 계대배양에서 4-8주된 재료식물의 절편체를 0~7일 전처리하여 조직배양에서 callus형성이 좋은 배지 NAA 0.1~0.25mg/l와 BAP 0.5~1.0mg/l에서 2일동안 cocultivation한 후, kanamycin 100mg/l와 carbenicillin 250mg/l이 첨가된 동일배지에 일주간격으로 8회 계대배양하여 형질전환체를 선발하였다. Kanamycin배지 내성선발은카네이션앞에서 callus형성이 양호한 호르몬조성 (NAA 0.5~1.0mg/l와 BAP 0.5~1.0mg/l)에 kanamycin 0, 50, 100, 150, 200, 300, 500mg/l을 첨가한 배지에서 1주간격으로 계대하여 생존하지 않는 100mg/l 농도에서 8주후 선발하였다.

5. DFR 형질전환체 검정

1) 형질전환체 PCR 검정

Kanamycin배지에서 선발된 형질전환체의 NPT II 와 DFR gene의 발현을 PCR로 분석하였다. PCR반응액조성은 DNA 10 μ l, 10X reaction buffer 5 μ l, dNTP mix 4 μ l, universe primer 1 μ l, reverse primer 1 μ l, 1 unit Taq polymerase, DW 29 μ l를 혼합하여 사용하였으며, 반응액의 표면에 약 20 μ l의 mineral oil로 피막처리하였다. PCR은 predenature (93 $^{\circ}$ C, 5분)한 다음 denature (93 $^{\circ}$ C, 1분), annealing (55 $^{\circ}$ C, 1분), elongation (72 $^{\circ}$ C, 2분)을 1 cycle로 해서 30cycle동안 증폭시켰다. 증폭이 끝나면 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 안정화시킨 다음 10 $^{\circ}$ C에서 유지되도록 하였다. 반응이 끝난 DNA는 0.8% agarose gel상에 분획하여 NPT II gene이 증폭되었는지 확인하였다. 8주동안 Kanamycin선발배지에서 선발된 형질전환개체에서, binary vector pGA748/DFR의 reporter gene인 NPT II의 발현을 확인하기 위하여, PCR분석을 하였다. PCR로 NPT II gene 확인된 형질전환개체에서 DFR gene이 증폭되었는지 확인하였다.

2) 형질전환체 Southern Blot 검정

PCR에서 NPT II와 DFR이 gene이 확인된 형질전환개체에서 NPT II와 DFR gene이 증폭되었는지 Southern Blot로 확인하였다. 이 방법은 virus Cp gene 검정과 동일한 방법을 적용하였다.

6. Carnation Flavonoid 분석

1) Bioimaging Analyzer에 의한 재료식물의 화색관련 유전자 분석

(1) 화색관련 DFR 생합성유전자 분석

Bioimaging Analyzer 이용에 의한 방사능표시기질 (radioactivemarker

substrate)의 정성 및 정량분석에 의해서 재료식물의 유전양식을 확인하고, 더 나아가서 형질전환식물체꽃의 분석에 의해서 화색DFR유전자의 형질 전환여부를 검정하기 위하여 화색동정체계를 확립하였다. 시료준비는 전 과정이 4°C에서 이루어졌으며, 20ml Tris-HCl buffer (pH7.5)를 5분간 끓여서 산소를 제거하고, 다시 in ice위에서 질소를 5분간 공급함으로써 산소를 완전히 제거하고, 2 μ l 2-Mercaptoethanol을 넣어 사용한다. 시료꽃봉오리의 꽃잎 (250mg), Dowex (125mg), Seasand (250mg)에 1ml buffer를 넣고 마쇄기에서 갈아서 4°C에서 10,000g로 5분간 2회 원심분리하여 상등액을 시료로 사용했다.

Enzyme assay는 방사능기질이 표시된 14C DHK (5,000dpm/40b)를 40 μ l 넣어 냉각회전건조시킨 effendorf에, 10 μ l NADPH (500nmol/H₂O), 40 μ l buffer, 50 μ l 시료를 섞어서, 30°C에서 30분간 incubation한 후, 100 μ l ethylacetate를 넣어 볼텍스로 잘 섞은 후, 13,000g에서 2분간 원심분리하여, cellulose TLC판에 시료를 조심스럽게 옮겨, CAW용매에서 chromatography하여 분리시켰다.

(2) 화색관련 CHS 생합성유전자 분석

시료준비는 전 과정이 4°C에서 이루어졌으며, 10ml 0.1M Kaliumphosphat buffer(pH7.0)에 20mM L-Ascorbic acid를 넣어 사용한다.

시료꽃봉오리의 꽃잎 (250mg), Dowex (500mg), Seasand (125mg)에 buffer 1.5ml를 넣고 마쇄기에서 갈아서 4°C에서 10,000g로 5분간 2회 원심분리하여 상등액을 시료로 사용했다.

Enzyme assay는 50 μ l buffer와 40 μ l 시료에 방사능기질 14C로 표시된 Malonyl-CoA (10,000 dpm)를 5 μ l에 P-Coumaroyl-CoA (2 nmol/ μ l) 5 μ l, Caffeoyl-CoA (2 nmol/ μ l) 5 μ l를 각각넣어 총 100 μ l 맞추고, 뚜껑을 닫고, 30°C에서 30분간 incubation한 후, 100 μ l ethylacetate를 넣어 볼텍스로 잘 섞은 후, 13,000g에서 2분간 원심분리하여, 상등액을 cellulose TLC판에 조심스럽게 옮겨, CAW용매에서 chromatography하여 분리시켰다.

(3) 화색관련 FHT 생합성유전자 분석

시료준비는 전과정이 4°C에서 이루어졌으며, 10ml 0.1M Tris HCl buffer (pH7.5) 에 28μM Mercaptoethanol 20μl와 20mM L-Ascorbic acid를 넣어 사용한다.

시료꽃봉오리의 꽃잎 (250mg), Dowex (250mg), Seasand (125mg)에 buffer 1.5ml를 넣고 마쇄기에서 갈아서 4°C에서 10,000g로 5분간 2회 원심분리하여 상등액을 시료로 사용했다.

Enzyme assay는 방사능기질이 표시된 14C Narginin (2100dpm/10μl) 25μl를 넣어 냉각회전시킨 effendorf에 120 μl buffer와 50μl시료에 Fe, As, Keto를 각각 10μl씩 넣어 총 200μl 맞추고, 뚜껑을 닫고, TCL에 30°C에서 30분간 incubation한 후, 100μl ethylacetate를 넣어 볼텍스로 잘 섞은 후, 13,000g에서 2분간 원심분리하여, 상등액은 cellulose TLC판에 조심스럽게 옮겨, CAW용매에서 chromatography하여 분리시켰다.

2) HPLC에 의한 재료식물 Anthocyanidin 분석

재료식물 'TG', 'VG', DS'에서 HPLC 사용을 위한 꽃잎시료에서 Anthocyan (Aglycones) 색소추출은, 꽃봉오리가 열리기 시작하는 6단계의 꽃잎 0.5g을 methanol 20ml에 담구어 4°C에서 72시간 색소를 추출한 다음, filter paper로 여과하여, 진공회전농축기(Büchi社)로 농축건조시킨 후, MeOH 1ml로 씻어 모은 다음, 4,000rpm으로 5분 원심분리하여 상등액을 냉동실에 보관하여 다음단계 처리에 사용하였다. 앞의 Anthocyanin이 추출농축된 150μl시료에 150μl 2N HCl 를 넣고 95°C에서 30분간 당을 가수분해 시켰다. 이 용액을 다시 SEP PAK C₁₈ minicolumn (Waters社)에 흡착시킨 후, 0.1M HCl 용액 5ml로 당을 제거하였다. 흡착된 안토시아니딘은 2ml 1% HCl-MeOH 로 용출시켰다. 용출된 안토시아니딘은 LUNA 5u C₁₈ column (250mm×4.60mm, Phenomenex社)을 이용하여 water : 100% acetic acid : absolute acetonitrile : absolute methanol (75:10:8:7, v/v)의 이동상에 시료 20μl를 주입한 후, 유속 1ml/min로 546nm에서 HPLC (Model LC-10ADvp HPLC Pump, Model SIL-10ADvp Auto Injector, SPD-M10Avp Absorbance, Class-Vp 5.0 Data Module, Shimadzu社)로 분석하였다(Wilkinson et al, 1977).

제 3 절 연구결과 및 고찰

1. 식물재료 수집

본 실험에서 사용한 carnation은, 1947년 화색발현에 관여하는 3개의 기본적인 유전자 Y, I, A 를 표현형의 분리비로 밝혔으며(Gaissman & Mehlquist), 그 후 1980년 생리생화학적 검정을 통하여 유전자 한개가 CHI의 활성화에 관여한다는 사실을 보고하였고(Forkmann & Dangelmayr), 1992년 유전자 A 의 역할이 DFR 와 관계함(Stich et al.)을 증명하였다. 이 inbreed line을 독일에서 분양받았다. Carnation inbred line은 대구가톨릭대학교의 온실과 노지에서 재배하였으며, 꽃은 각 개화단계별로 수확하여 바로 액체질소로 냉동 후 -70°C에 저장하여, 필요에 따라 사용하였다.

카네이션 'Tanga', 'Virginie', 'Desio' 3품종을 식물재료로 확보하였다.

2. DFR 유전자분리 및 유전자조각

1) *Dianthus caryophyllus* L. 의 꽃잎으로부터 cDNA library의 합성

Carnation품종 'Desio'의 꽃봉오리 10g을 액체질소를 첨가한 막자사발에서 분쇄한 후, guanidium chloride방법을 사용하여, total RNA를 분리한 결과 4.272mg를 얻었으며, 1ml의 전체 total RNA중 5 μ l를 sepectrophotometer를 통해 230nm, 260nm, 280nm의 서로 다른 파장을 확인하였다. 1차 oligo-dt cellulose coloum을 통하여 38 μ ld의 mRNA를 얻었으며, 2차 coloum을 통과 한 후 15 μ l의 순수한 mRNA를 분리하였다. 이중 5 μ l의 mRNA를 cRNA library 합성에 사용하였다.

sample	230nm	260nm	280nm
Ref.	0.000	0.000	0.000
1	0.249	0.534	0.262
0.534 X 40 X 200 = 4272 μ g Total RNA			4.272mg

2) 국내 카네이션 화색관련 DFR생합성유전자 Screening

합성된 cDNA library로부터, 옥수수의 DFR유전자인 A₁유전자를 probe로 사용하여 screening하여 본 결과, 6개의 0.6kb크기의 분리하였으며, 이 clone들은 다른 식물체의 또 하나의 *Eco*R1 site가 있음을 추측할 수 있으며 sequencing을 통하여 차 후 확인하였다. 이 6개의 clone들을 역시 southern blot analysis를 통해 검정해 본결과 모두 DFR유전자임을 확인하였다(그림21).

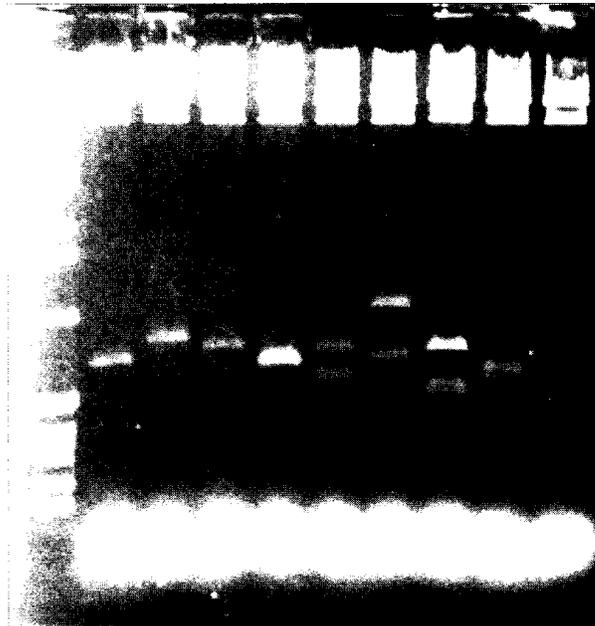


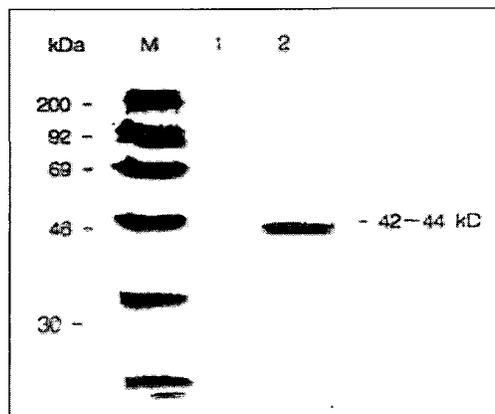
Figure 21. Screening of DFR gene

4) DFR 유전자 G/C 함량분석

분리한 carnation의 DFR cDNA의 coding region의 염기배열을 분석하여, G 와 C의 함량을 조사한 결과, 45.1%를 나타내었고, 이것은 이미 밝혀진 다른 쌍자엽식물의 DFR 유전자와 유사한 수치 (41.5%-45.1%)를 보였으며, 외자엽식물인 옥수수 (65.2%)와 보리 (64.0%)에 비해 현저하게 낮은 함량을 보였다. 이러한 차이는 특히 세 번째 codon의 G/C 함량에 있어서 더욱 확실하여 쌍자엽식물의 경우는 40.8%-48.5%의 함량을 보인 반면, 단자엽식물인 보리와 옥수수의 경우는 각각 89.3%, 89.4%의 높은 함량을 나타내었다.

5) *in vitro* transcription 과 translation

분리한 유전자의 발현을 증명하기 위하여, 먼저 유전자를 Bluescript KS⁺ vector에 sense와 antisense방향으로 cloning 한 후, T7-RNA-Polymerase 와 T3-RNA-Polymerase를 이용하여 transcription 시키고, 생성된 mRNA를 다시 reticulocyte system과 [35S]-Methionin labelling을 이용하여 translation을 유도한 후, 생성된 protein을 SDS-PAGE를 통해 확인한 결과, 분리한 DFR유전자와 같은 42-44kDa 크기의 protein을 확인하였으며, negative control로 사용한 antisense 방향에서는 protein이 합성되지 않았다(그림23).



M : Protein marker

1 : Antisense

2 : Sense of *D. caryophyllus* L.

Figure 23. *In vitro* expression of DFR-cDNAs from *Dianthus caryophyllus*

6) 재료식물의 DFR 유전자 Northern Blot 분석

카네이션에서 유전적, 생화학적으로 알려져 있는, 2개의 품종, 즉 'TG', 'VG' 를 확인하기 위하여, 앞의 실험에서 분리한 carnation의 DFR유전자를 probe로 Northern blot 분석을 한 결과, 그림 24에서 보는 바와 같이 야생종인 품종 'TG'는 1.4kb크기의 강한 signal을 보였고, A gene mutant 'VG' 품종은 mRNA 단계에서 아무런 signal을 보이지 않았다. 이러한 결과로 봐서 품종 'VG'는 DFR유전자가 blocking 되어 anthocyanin을 합성하지 못하므로 하얀색의 꽃을 보임을 알 수 있다.

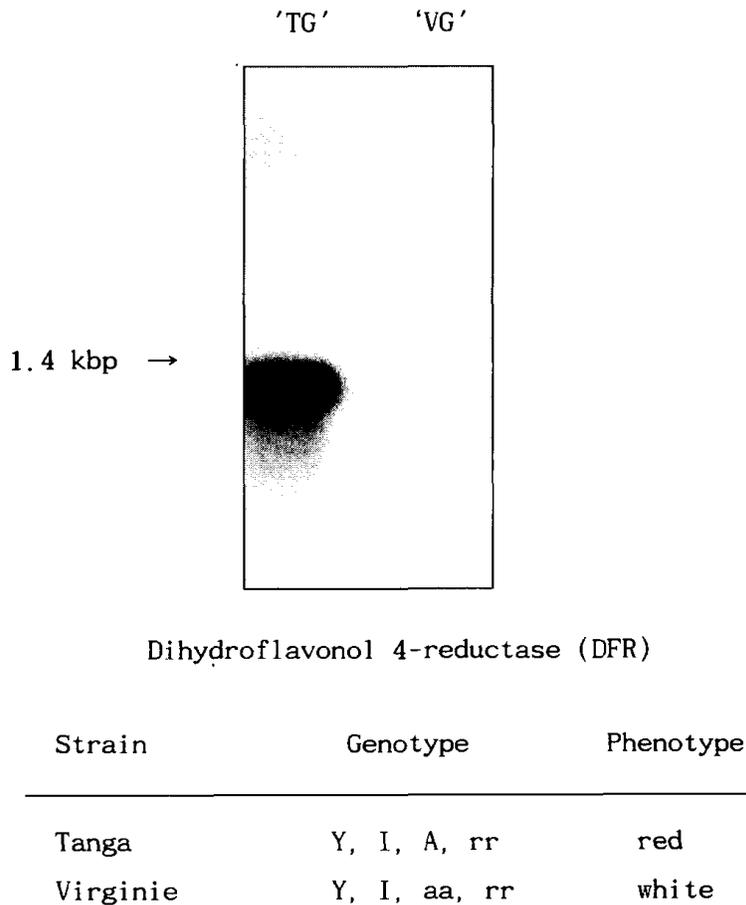


Figure 24. Northern blot analysis of *Dianthus caryophyllus*

7) DFR gene의 plant expression vector 내로의 subcloning

Carnation DFR 유전자를 *Agrobacterium*을 통하여 식물체내로 전이시키기 위하여는, 먼저 binary vector 인 pGA748의 multiple cloning site의 *EcoRI* site에 DFR 유전자를 cloning하여야 하는데, 이를 위하여 먼저 pUC19에 cloning된 DFR 유전자를 *EcoRI* 으로 partial digestion하여, 1.2kb의 band를 elution한후, pGA748의 *EcoRI* site에 연결하여 plant expression vector pGA748/DFR을 제조하였다(그림25).

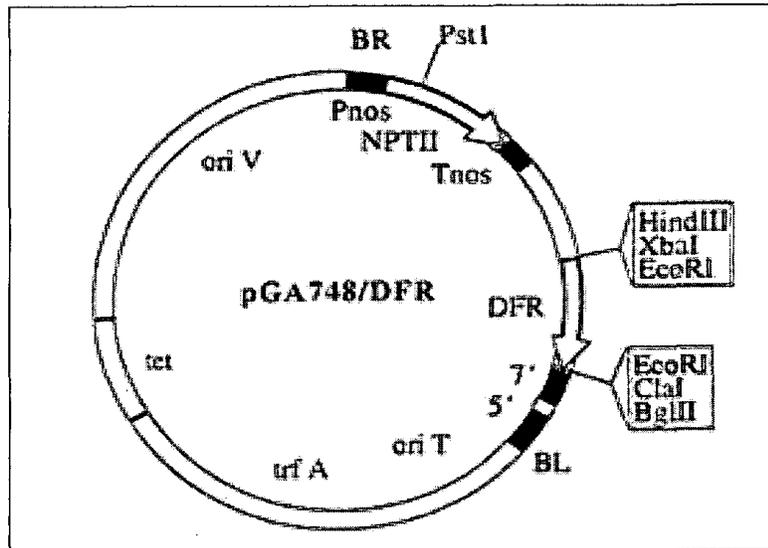


Figure 25. Construction of pGA748/DFR

3. 재료식물체 재분화

'VG', 'DS' 품종의 조직배양은 표9에서와 같이 2가지 품종에서 앞절편 19가지 조합구에서 callus와 shoot가 형성되었다. 'Virginie'는 NAA 0.1~0.25mg/l와 BAP 1.0~3.0mg/l, 'Desio'는 NAA 0.1mg/l와 BAP 2.0~3.0mg/l에서 shoot형성이 잘 되어서 품종간 차이가 보였으며, 전체적으로 NAA는 0.1~0.25mg/l, BAP는 0.5~3.0mg/l로 NAA농도보다 BAP의 농도요구도가 높음을 알 수 있었다.

Table 9. Effects of NAA and BAP combinations on shoot induction and organogenesis from *Dianthus caryophyllus* L. cultivar.

BAP		0.25	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
NAA(mg/l)							
	cv.						
0.1	'VG'		CS**	CS**	CS**	CS***	CS
	'DS'		CS*	CS*	CS***	CS***	
0.25	'VG'		CS	CS**	CS*	CS*	CS*
	'DS'		CS	CS	CS	CS*	
0.5	'VG'		CS*	CS	CS*	CS**	
	'DS'		CS**	CS*	CS*		
1.0	'VG'	CS	CS		CS	CS	CS*
	'DS'	CS	C		CS*	CS*	CS
1.5	'VG'						
	'DS'		CS*	C	C	C	C

cv.: Cultivar, 'VG': 'Virginie', 'DS': 'Desio'

C: Callus, CS: Callus+Shoots

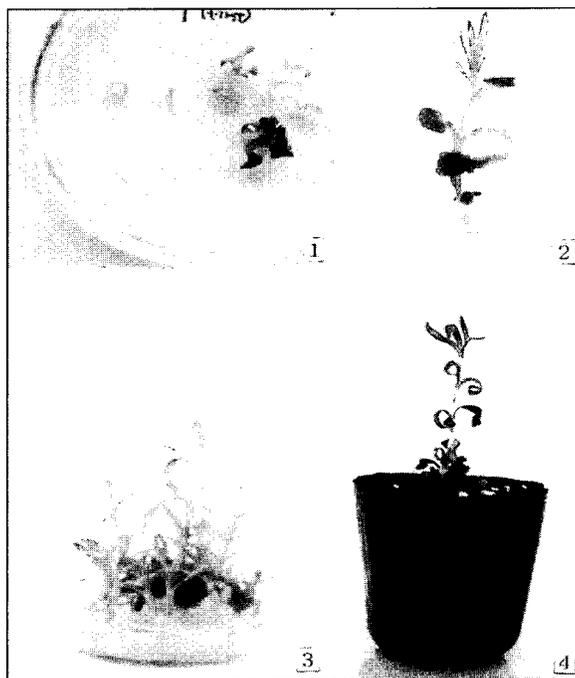
Shoot formation: ****very good, **good, *morderate

4. DFR 형질전환체 개발

Kanamycin 100mg/l 농도에서 8주 선발기간중 4-5주에 많은 개체가 백화하여 고사하며, pGA482의 NPT II gene은 538절편을 접종하여 8째주에는 8개체가 shoot가 형성되었고 현재 기내발근배지에 3개체가 생존하고 있다. 그리고, pGA748/DFR의 sense gene을 넣은것은 4997절편체를 접종하여, 8째주에는 60절편체에서 shoot가 형성되었고, 현재 35개체가 생존하고 있다(표10). 그리고, pGA748/DFR의 antisense gene을 넣은것은 1556절편체를 접종하여, 8째주에는 6절편체에서 shoot가 형성되었고, 현재 6개체가 생존하고 있다(표10, 그림26).

Table 10. Extent of the transformation ratio of *Dianthus caryophyllus* L. cocultivated with pGA748 sense/antisense.

No. of explant cocultivated(a)	Kanamycin									Transformant plant		
	week									(month)		
	1	2	3	4	5	6	7	8	b/a (b) (%)	1	3	
'VG'	4997	2081	1727	1176	637	271	138	69	60	1.2		35
'TG'	1556	575	471	284	134	60	14	9	6	1.0	6	6



1),2) Transgenic plant from kanamycin resistant callus of 'Virginie' after 8 weeks (1) and 15 weeks cocultivation (2).

3),4) Transgenic plant from kanamycin resistant callus of 'Virginie' after 20 weeks (3) and 24 weeks cocultivation (4).

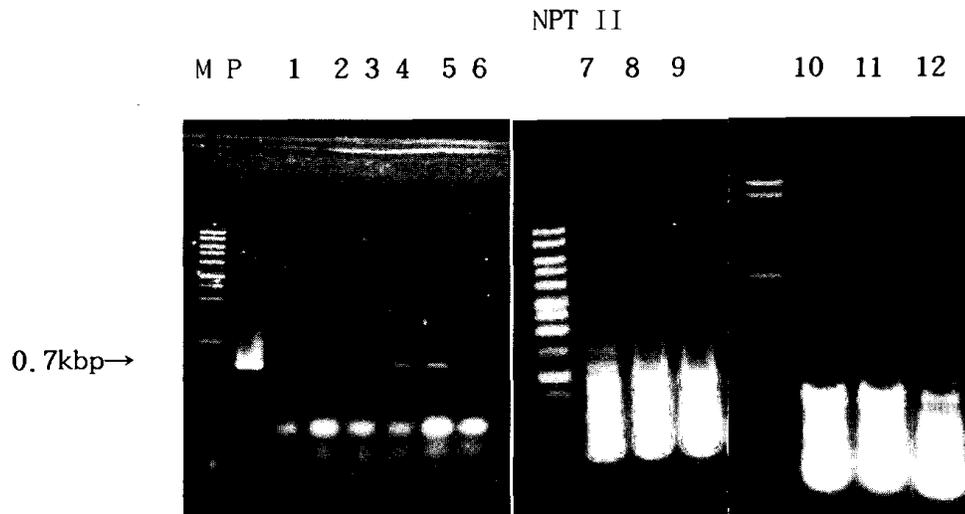
Figure 26. Regenerated plants in DFR sense gene transformation of *Dianthus caryophyllus* 'Virginie'.

5. 형질전환체 검정

1) 기내형질전환체 PCR검정

(1) NPT II gene의 PCR검정

8주동안 kanamycin선발배지에서 선발된 형질전환개체에서, binary vector pGA748/DFR의 reporter gene인 NPTII의 발현을 확인하기 위하여 PCR분석을 한결과, 12개체에서 0.7Kbp 위치에서 band가 관찰되었다(그림27). 따라서 reporter gene인 NPT II gene이 발현되었다는 것을 알 수 있었다.



P : Control pGA748/NDFR sense DNA

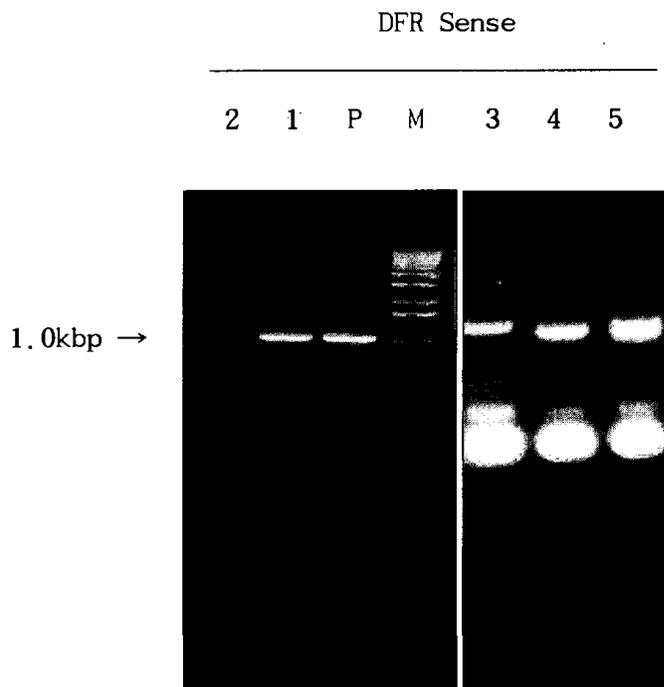
M : Marker

lane 1~12: Transgenic plant

Figure 27. PCR analysis of total DNA isolated from transgenic *Dianthus caryophyllus* L. 'Virginie'

(2) DFR gene의 PCR검정

NPTII gene 확인된 형질전환카네이션개체에서, DFR gene이 증폭되었는지 확인한 결과, 1.0kbp위치에서 4개체에서 band가 관찰되었다(그림28). 따라서 화색관련 DFR gene이 발현되었다는 것을 알 수 있었다.



M : Marker

P : Control pGA748 / NDFR sense

Lane 1, 3, 4, 5 : Transgenic plant

Lane 2 : Negative control plant

Figure 28. PCR analysis of DFR sense gene isolated from transgenic *Dianthus caryophyllus* L.

2) 형질전환체 Southern Blot 검정

PCR에서 NPT II gene 확인된 형질전환카네이션개체에서, DFR gene이 증폭되었는지 Southern Blot로 확인한 결과, 1.2kbp위치에서 band가 관찰되었다(그림 29). 따라서 화색관련 DFR gene이 발현되었다는 것을 알 수 있었다.

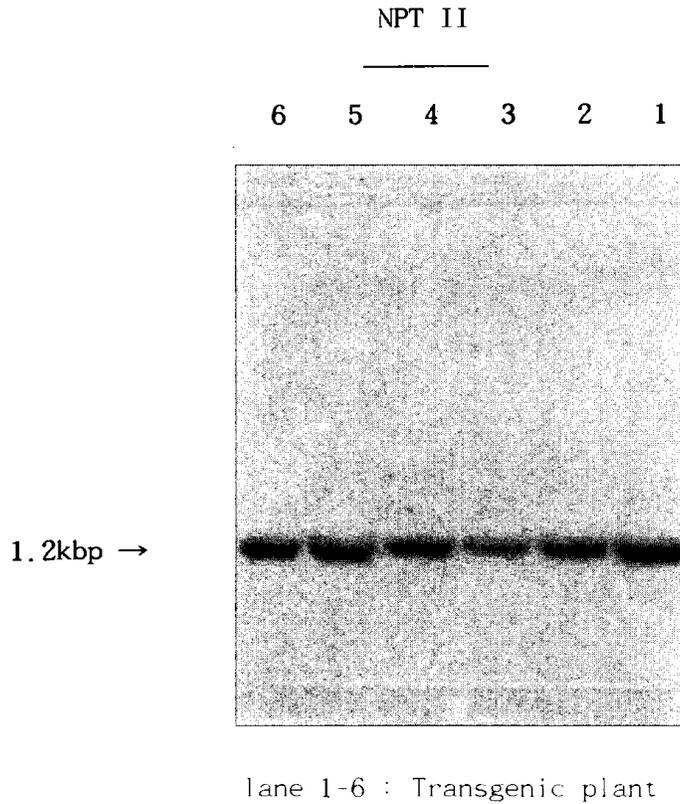


Figure 29. Southern blot analysis of total DNA isolated from transgenic *Dianthus caryophyllus* L.

6. Carnation Flower Flavonoid 분석

1) Bioimaging analyzer에 의한 재료식물의 화색관련 유전자 분석

(1) 화색관련 DFR 생합성유전자 분석

Bio Imaging Analyzer 이용에 의한 방사능표시기질(radioactivemarker substrate)의 정성 및 정량분석에 의해서 재료식물의 유전양식을 확인하고, 더 나아가서 형질전환식물체꽃의 분석에 의해서 화색DFR유전자의 형질전환여부를 검정하기 위하여 화색동정체계가 확립되었다. 그 결과 Flavonoid가 분리된 TLC판을 Imaging Analyzer에 넣어서 현상시킨 결과 그림30에서와 같이 'Tanga'와 'Desio'품종에서는 Lpg(Leucopelargonidin)이 생긴 것으로 봐서 DFR생합성유전자가 우성으로 발현함이 확인이 되었고, 'Virginie'품종에서는 Lpg가 확인이 되지 않음을 보아서 DFR조절유전자는 열성인 것이 밝혀졌다(그림30).

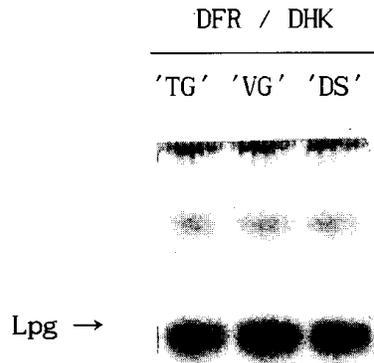


Figure 30. Bioimaging Analyzer of DFR gene in Carnation flower

(2) 화색관련 CHS 생합성유전자 분석

Flavonoid가 분리된 TLC판을 Imaging Anlayzer에 넣어서 현상시킨 결과 그림31에서와 같이 'Tanga', 'Virginie'와 'Desio' 품종에서 NAR(Narginin)과 ERI(Euidiatiol)이 생긴 것으로 봐서 CHS생합성유전자가 우성으로 발현함이 확인이 되었다(그림31).

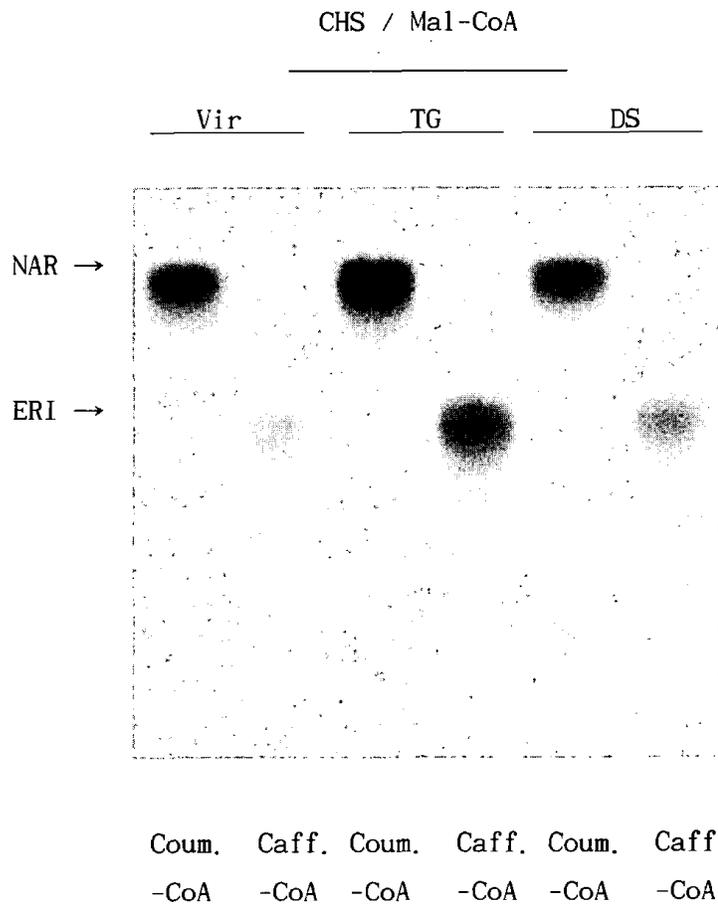


Figure 31. BioImaging Analyzer of CHS gene in Carnation flower

(2)화색관련 FHT 생합성유전자 분석

Flavonoid가 분리된 TLC판을 Imaging Anlayzer에 넣어서 현상시킨 결과 그림32에서와 같이 'Tanga', 'Desio' 품종에서는 DHK를 합성한 것을 봐서 FHT 생합성유전자가 우성으로 발현되었음이 확인되었다(그림32).

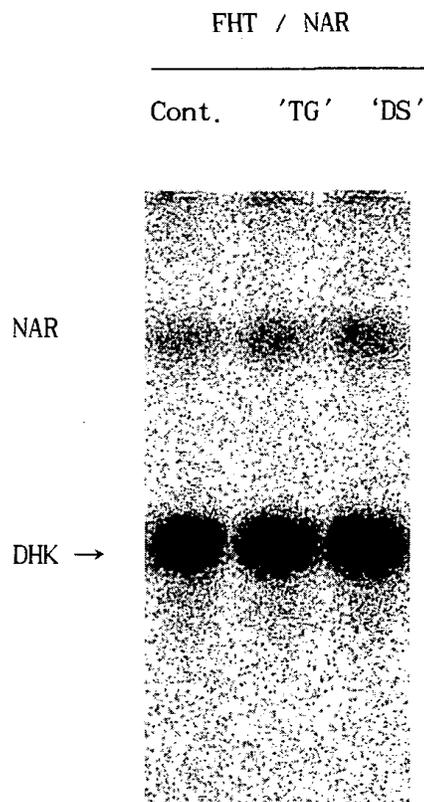


Figure 32. BioImaging Analyzer of FHT gene in Carnation flower

2) HPLC에 의한 재료식물의 Anthocyanidin 분석

재료식물 'TG', 'DS', 'VG'를 HPLC분석한 결과, 적색의 'TG'와 'DS'에서는 Pg이 형성되었으나, 흰색 'VG'에서는 Pg피크가 형성되지 않았다(그림33).

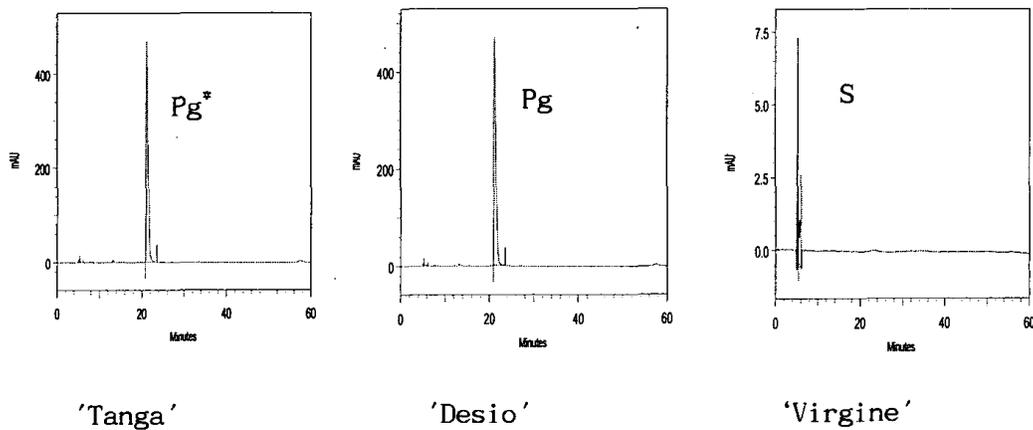


Figure 33. HPLC chromatograms of anthocyanidins in petals of *Dianthus caryophyllus* L. cultivars. Each peak on chromatogram applied by the wavelength of maximum absorbance.

* Pg: Pelargonidin, S: Solvent

7. DFR 형질전환개화개체의 Phenotype 조사

처음으로 4개의 꽃이 개화한, 두 'VG' 형질전환개체 (sense) 에서, 흰 바탕에 적색점이 들어간 형질전환된 꽃이 피었다. 두꽃이 개화한 'TG' 형질전환 (antisense gene) 개체에서는 적색바탕에 흰점이 들어간 꽃이 피었다. 나머지 38개체에서는 아직 꽃이 피지 않았다. 이로써 'VG', 'TG'에서 유전자가 형질전환된 것이 발현되었다. 그러나 불완전한 발현이었다. 즉, 'VG' 흰색품종에 DFR sense gene 형질전환 경우, 흰색바탕에 적색반점을 나타내었고, 'TG' 적색품종에 antisense gene 형질전환 경우, 적색바탕에 흰색반점이 나타났다(그림34).

8. 나머지 38형질전환개체의 후대표현형은 앞으로 연구검토대상이 될 것이며, 좀더 다양하고, 유용한 적색변이체를 얻을 수 있길 기대한다.

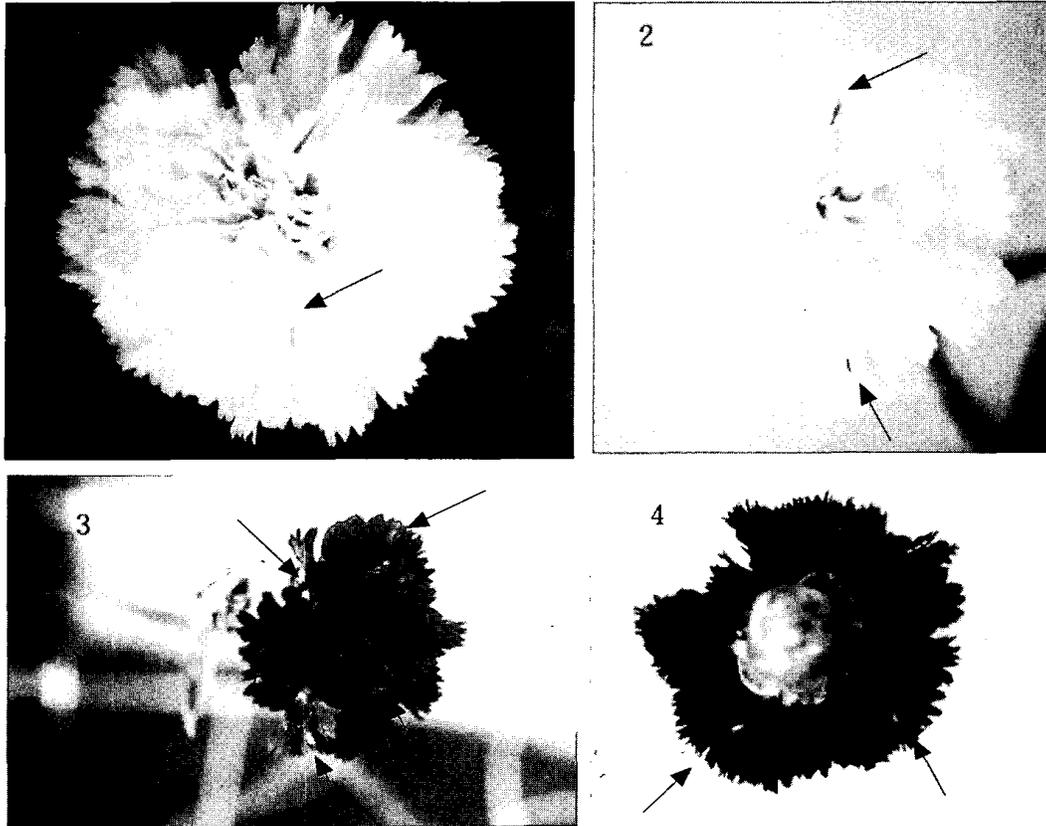


Figure 34. Transformant 'VG' (sense) shows red spots on white background (1,2) of the flower petals, and transformant 'TG'(antisense) shows white spots on red background in colour (3,4)

제 4 장 결론

I. 항 virus성 카네이션 분자유종

카네이션(*Dianthus caryophyllus* L.)은 국내외적으로 중요한 切花로서 (Zuker, et al, 1999), 국내의 연간농가생산액이 162억원에 이르는 주요 작물로(농림부자료, 2000), 절화농가의 주요 수입원이나, 카네이션은 주로 묘주를 수입에만 의존하고, 거의 수출되지 않는 상태며, 수입묘의 자급자족과 수출을 위한 국제 경쟁력을 확보하는 것이 절실히 요구된다.

바이러스병방제는 곤충이나 선충의 부분적인 전이를 막는 이외에 특별한 화학적 방제법이 없고, 교잡육종에 의한 바이러스내성유전자의 유전은, 대부분의 내성계통들이 multigene에 의한 horizontal resistance로 어려움이 있어, 국제적으로도 아직 뚜렷한 품종을 개발하지 못하고 있다. 이 때문에 분자생물학적으로 병원체의 항바이러스성 유전자를 분리하여 식물체에 도입시킴으로써, 형질전환을 이용한, 바이러스 저항성 품종의 개발이 요청된다.

본 실험의 재료식물인 카네이션에 감염되는 바이러스는, 9가지가 알려져 있고, 그 중 CarMV는 세계 어느 지역에서나 감염되어 있고, 이들 바이러스의 감염정도, 단독 또는 복합감염에 따라 생육과 절화품질에 큰 영향을 끼친다. 특히 CarMV와 CarRSV가 복합감염시 치명적인 피해를 주어, 절화수량과 품질을 크게 떨어뜨린다(Cheon et al., 1992; and Lee, 1992). 이에 대한 해결방안으로 조직배양을 통한 무병주묘의 생산 (Stone, 1963)은 소극적인 예방에 그치므로, 재배기간중의 감염에 저항성을 가져, 건전한 꽃을 얻기 위하여, 형질전환에 의한 항바이러스성 카네이션품종 육성과 복합바이러스내성 카네이션품종 육성이 절실히 요구되어지고 있다.

본 연구는 카네이션에 주로 알려진 9종의 바이러스 중, 주요 피해 바이러스인 CarMV와 CarRSV에 대한, 복합바이러스내성 카네이션품종육성을 위한 기초연구

로서, CarMV Cp 와 CarRSV Cp 유전자를 카네이션에 도입하여, CarMV와 CarRSV 에 저항성을 나타내는 품종육성을 하고자, 조직절편체를 통한 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 형질전환을 수행하였다.

그 연구결과는 pGACarMV Cp gene의 형질전환은 2품종에서 총3754절편체를 접종하여, Kanamycin선발 8주에는 126절편체에서 shoot가 형성되었고, 4달후 93개체가 생존하고 있고, 지피포트에 3개체, 화분4개체를 이식하였다. pGACarRSV Cp gene의 형질전환은 'HD'품종에 163절편체를 접종하여, 8주에는 7절편체에서 shoot가 형성되었고, 현재 7개체가 *in vitro*에 생존하고 있으나, 아직 약하므로 차후 *in vitro* 에서 더 증식시켜, 유전분석과 포트이식을 할 계획이다.

CarMV Cp gene 형질전환체 검정은 PCR분석결과 Kanamycin선발 형질전환개체에서 NPT II gene은 약 0.7Kbp 위치에서 확인되었고, Cp gene은 약 1.1Kbp 위치에서 확인되었다. Southern hybridization 분석결과는 npt II gene을 13.2kbp에서 확인되었고, Cp gene은 1.1kbp에서 확인되었다. PCR과 Southern blot 분석결과 CarMV Cp 유전자가 도입된 형질전환체로 판명되었다. 그리고 형질전환 카네이션식물체의 조직에 CarMV Cp가 전사 및 단백질로 번역되었는지 여부를 조사하기 위하여 western blot을 실시하였으며, 35kDa에서 발현이 확인되었다.

형질전환식물체의 순화, 포장적응성 및 표현형으로 나타난 형질에 대해 조사하였다. 형질전환식물체의 경우 kanamycin 선발후 기내 생존율은 74%이며 포트로의 이식율은 10% 정도였다. 포트에 생존된 7개체가 형질전환식물체의 대부분은 정상적인 생육상태를 보였으나, 일부 개체는 성장속도가 느리고, 약한 양상을 보였다.

형질전환개체의 생물검정은 투명한 형질전환개체를 먼저 정상식물로 만들기 위해, 강건묘배지에서 정상식물로 만들어, 발근배지에서 발근, 순화시켜 포트에 옮기기까지 3-4개월 이상 소요되었다. 기내환경에서 온실이나 노지조건으

로 옮긴 후, 느린 발육상태와 함께 생존하지 못하는 문제점이 해결되기까지는 다소 시일이 걸릴 것으로 예상된다. 현재 화분에 4개체가 있으며, 이를 삼목 번식한 후 생물검정을 할 계획이다.

앞으로 생물검정으로 CarMV에 대한 내병성을 검정한 후, 특허권을 신청할 계획이며, 그 후 virus내병성 품종육성을 위한, 교잡육종의 모본재료식물로써 원예시험장의 숙근실에도 제공할 예정이다.

2. 화색조절 분자유종

본 연구는 carnation mutant 'VG'백색품종에 'DS'적색품종의 A gene (DFR생합성유전자)를 유전자조작한 다음, 'VG'품종에 형질전환하여, DHK기질을 촉매하여 Leucopelargonidin biosynthesis를 유도하는 한편, DFR antisense 유전자를 'TG'품종에 도입하여, DFR불활성을 유도하여, DHK기질의 사용을 억제시켜, 적색변이화색을 유도하여, 고품질카네이션 육성을 위한, 화색 분자유종기술방법의 체계확립을 하고자 하였다. 재료품종에 대한 Flavonoid 생합성대사경로는 그림 35와 같다.

그결과 'VG'품종(sense)에서 35개체의 형질전환개체를 얻었으며, 그중 처음으로 두 형질전환개체에서 4개의 꽃이 개화하여, 흰 바탕에 적색점이 들어간 형질전환된 꽃이 피었다. 'VG'품종의 조직절편체는 'DS'의 A gene의 cDNA clone이 포함된, 식물발현 벡터 pGA748/DFR의 DNA가 형질전환된것이며, 그 A 유전자로 encodes된 DFR효소는 DHQ를 LCy으로 전환하여, 'DS'꽃의 Pg-전구 물질을 생산하였다. 한편, 'TG' 품종에서 두꽃이 개화한 한 형질전환체 (antisense gene)에서는, 적색바탕에 흰점이 들어간 꽃이 피었다. 이 로써 'VG'나 'TG'형질 전환체에서 유전자가 발현되었다. 그러나 불완전한 발현이었다. 즉, 'VG' 흰색품종에 DFR sense gene 형질전환 경우, 흰색바탕에 적색반점을 나타내었고, 'TG' 적색품종에 antisense gene 형질전환 경우, 적색 바탕에 흰색반점이 나타났다.

형질전환율도 DFR sense gene을 'VG'품종 4997절편체에 접종하여, kanamycin

선발 8주 후에는 60절편체에서 shoot가 형성되었고, 4달후 35개체가 생존하고 있으며, 그중 3개체가 개화하였고, 'TG'는 1556절편체를 접종하여 8주후 6절편체에서 shoot가 형성되었고, 3개월후 6개체가 생존하고 있으며, 그중 1개체가 개화하였다.

형질전환개체의 유전자수준에서의 검정은 PCR분석결과, Kanamycin선발 형질전환개체에서 NPTII gene은 약 0.7Kbp 위치에서 확인되었고, DFR gene은 약 1.0Kbp 위치에서 관찰되었다. Southern hybridization 분석결과 npt II gene을 1.2kbp에서 확인할 수 있었다. PCR과 Southern blot 분석결과 DFR 유전자가 도입된 형질전환체로 확인되었다.

나머지 38개체의 형질전환체에서는 아직 꽃이 피지 않았다. 그 후대 표현형은 앞으로 연구검토대상이 될 것이며, 좀더 유용하고 다양한 적색변이체를 얻을 수 있기를 기대한다.

카네이션에서 DFR gene의 형질전환 기술확립은 다음단계의 F3'5'H유전자(청색)의 형질전환의 가능성을 보여준다.

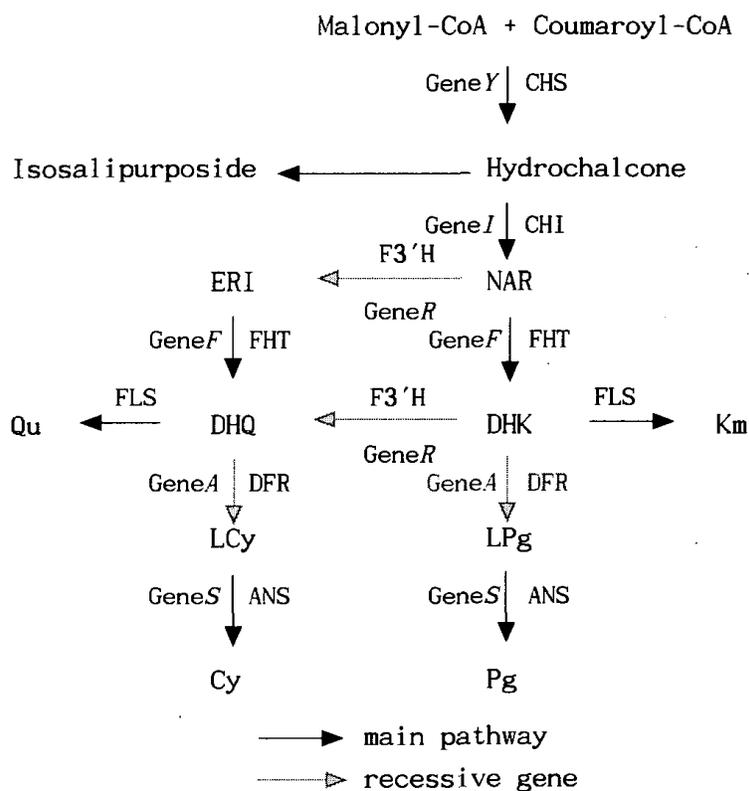


Figure 35. Biosynthetic pathways to flavonoids in *Dianthus caryophyllus* 'Virgine' flowers.

CHS: chalcone synthase, CHI: chalcone isomerase
 FHT: flavanone 3-hydroxylase, F3'H: flavonoid 3' hydroxylase
 FLS: flavonol synthase, DFR: dihydroflavonol 4-reductase
 ANS: anthocyanidin synthase, DHQ: dihydroquercetin
 NAR: naringenin, DHK: dihydrokaempferol
 ERI: Eriodictyol, Qu: quercetin,
 Km: kaempferol, Cy: cyanidin
 LCy: leucopelargonidin,

인용문헌

Ballinger, W.E. and E.P. Menesse, G.J. Galletta, and L.J. Kushman. 1972. Anthocyanins of ripe fruit of a pink-fruited hybrid of highbush blueberries, *Vaccinium corymbosum* L. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 97, 381-384.

Brierley P. & F. F. Smith. 1957. Carnation viruses in the United States. *Phytopathology* 47: 714-721.

Brierley P. & F. F. Smith. 1955. Two sap-transmissible viruses from carnation. (Abstr.) *Phytopathology* 45: 464.

Britsh, L., Dedio, J., Saedler, H. and Forkmann, G. 1993. EMBL-library, accession numbers X72592 (*Dianthus caryophyllus*), X72593 (*Callistephus chinensis*), X72594 (*Matthiola incana*).

Cheon J. U., E. J. Lee 1992. Studies on carnation mottle virus in Korea: 2. Light microscopic approach to *Chenopodium amaranticolor* leaves infected with carnation mottle virus. Research reports of the rural development administration(Suweon) 34: 28-32.

Cheon JU, Lee JS, Ryu HY, Lee EJ 1992. Studies on carnation mottle virus in Korea. I. Isolation and identification of carnation mottle virus. *Korean J Plant Pathol* 8: 144-148.

Dedio, J., Saedler H. und Forkmann, G. 1995 Molecular cloning of the flavanone 3 β -hydroxylase gene (FHT) from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and analysis of stable and unstable FHT mutants. *Theor. Appl. Genet.* 90: 611-617.

Forkmann G., J. Dedio, J. Henkel, B. W. Min, M. Wassnegger 1995. Genetics, Biosynthesis and molecular biology of flower colour of *Dianthus caryophyllus* (carnation). XVIIIth EUCARPIA SYMPOSIUM.

Forkmann, G. and Dangelmayr, B. 1980. Genetic control of chalcone isomerase activity in flowers of *Dianthus caryophyllus*. Biochem. Genet. 18: 519-527.

Geissman, T. A. and Mehlquist, G. A. L. 1947. Inheritance in the carnation, *Dianthus caryophyllus* IV. The chemistry of flower color variation I. Genetics 32: 410-433.

Goldy, R.G., W.E. Balliger, and E.P. Manesse 1987. Anthocyanin content of fruit, stem, tendril, leaf, and leaf petioles in muscadine grape. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 112: 880-882.

Gonzalez M., L. Di Feo. S. F. Nome 1990. Identification of carnation (*Dianthus caryophyllus*) viruses in Argentina. Fitopatologia Brasileira 15(4): 291-293.

Haselkorn R. 1966. Physical, chemical properties of plant viruses. Ann. Rev. Plant Physiol. 17: 137-154.

Hong YP, Ko KH (1969) Investigation of carnation virus diseases in Korea. I. Isolation and identification of carnation viruses in Korea. Res Rep of RDA 12: 83-89.

Jones, T.M. and P. Albersheim. 1972. Chromatographic method for the determination of aldoses and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. Plant Physiol. 49: 926-936.

- Kalmakoff, J. and Tremaine J. H. 1967. Some physical and chemical properties of carnation ringspot virus. *Virology* 33: 10-16.
- Kassanis B. 1955. Some properties of four viruses isolated from carnation plants. *Ann. Appl. Biol.* 43: 103-113.
- Kemp W. G. 1964. The identity of two sap transmissible viruses in carnation in Ontario. *Can. J. Bot.* 42: 45-55.
- Kendall T.L. and Lommel. S. A. 1992. Nucleotide sequence of carnation ringspot dianthovirus RNA-2. *J. General virol.* 73, 2479-2482.
- Kowalska A. 1973. Investigations into the occurrence of carnation mottle virus and the carnation ringspot virus on the glasshouse carnation cultures in central Poland(*Dianthus caryophyllus*). *Hodowla. Roslin. Aklimatyzacja. Nasiennictwo* 17(13): 53-63.
- Kowalska A. 1972. Studies on the propertiw of carnation mottle virus and carnation ringspot virus isolated in Poland. *Phytopathol. Z.* 74(4): 329-341.
- Lommel S. A., A. H. McCain, T. J. Morris 1982. Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses carnation mottle virus, carnation ringspot virus. *Phytopathology. St. Paul, Minn.* 72(8): 1018-1022.
- Lu C.Y., Nugent G., Wardley-Richardson, T., Chandler S.F., Young, R. and Dalling M.J. 1991. Agrobacterium-mediated transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Biotechnology.* 9: 864-868.
- Mehlquist, G. A. L. and Geissman, T. A. 1947. Inheritance in the carnation(*Dianthus caryophyllus*). III. Interitance of flower color. *Ann. Miss. Bot. Garden* 34: 39-74.

Michael, M.Z., Savin, K.W., Baudinette, S.C., Graham, M.W., Chandler, S.F., Lu, C.Y., Caesar, C., Gautrais, I., Young, R., Nugent, G.D., Stevenson, K.R., O'connor, E.L.J., Cobbett, C.S. and Cornish, E.C. 1993. Cloning of ethylene biosynthetic genes involved in petal senescence of carnation and petunia, and their antisense expression in transgenic plants. In Cellular and Molecular Aspects of the Plant Hormone Ethylene. J.C. Pech (ed). Kluwer Academic Publishers. pp 298-303.

Min, B.W., 1994, Klonierung flavonoidspezifischer Gene aus cDNA-Bibliotheken verschiedener Blütenpflanzen und die Charakterisierung ihrer Expression in einem genetisch definierten Pflanzenmaterial, Ph.D. Thesis, T.U. München Weihenstephan. Germany.

Noordam D., T. H. Thung, and J. P. H. van der Want. 1951. Onderzoekingen over anjermosaiek. Tijdschr. Plantenziekten 57: 1-15.

Noordam D., T. H. Thung, and J. P. H. van der Want. 1951. Onderzoekingen over anjermosaiek. Tijdschr. Plantenziekten 57: 1-15.

Park Won mok, Kim woo gap, Ryo ki hyun, Yoon kyung eun, Kwack Beyoung Hwa, So in sup. 1993. Detection of Odontoglossum Ringspot Virus and Cymbidium Mosaic Virus from cultivated Orchids by Immunosorbent Electron Microscopy. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 31(4): 417-422.

Ryabov. E. V., Generozov, E. V., Kendall. T.L., Lommel S. A. and Zavirev S. K. 1994. Nucleotide Sequence of carnation ringspot dianthovirus RNA-1. J. General viral. 75: 243-247

Salomon R. , M. Bar-Joseph, H. Soreq, I. Gozes, and U. Z. Littauer. 1978. Translation in vitro of carnation mottle virus RNA. Regulatory function of the 3'-region. 90: 288-298.

Seitz, C., YU, Sun-Nam, Martens, S., Forkmann, G., 2001, Flavonoids and flower color in *Lilium-Hybrida* : Why are flowers of *Lilium longiflorum* white?, Eucarpia, 1-3. July. 2001.

Spribilloe, R. und Forkmann, G. 1982 : Chalcone Synthesis and Hydroxylation of Flavonoids in 3'-Position with Enzyme Preparation from Flowers of *Dianthus caryophyllus* L. (Carnation). *Planta* 155: 176-182.

Stich, K., Eidenberger T., Wurst F. und Forkmann, G. 1992 : Enzymatic conversion of dihydroflavonols to flavan-3,4-diols using flower extracts of *Dianthus caryophyllus* L. (carnation). *Planta* 187: 103-108.

Stich, K., Eidenberger T., Wurst F. und Forkmann, G. 1992 : Enzymatic conversion of dihydroflavonols to flavan-3,4-diols using flower extracts of *Dianthus caryophyllus* L. (carnation). *Planta* 187: 103-108.

Stich, K., Eidenberger T., Wurst F. und Forkmann, G. 1992 : Flavonol Synthase Activity and the Regulation of Flavonol and Anthocyanin Biosynthesis during Flower Development in *Dianthus caryophyllus* L. (Carnation) *Z. Naturforsch.* 47c: 14-21.

Tremaine J. H. 1970. Physical, chemical, and serological studies on carnation mottle virus. *Virology* 42: 611-620.

Tremaine J. H. and Ronald W. P. 1976. Differential effects of sodium dodecyl sulfate on strains of carnation ringspot virus. *J. Gen. Virol.* 30: 299-308.

Tremaine J. H. and W. P. Ronald. 1985. The effect of pH and some selected chemicals on the temperature-reversible aggregation of carnation ring spot virus. *Physiology and Biochemistry.* 75(4): 467-471.

Tremaine J. H., Ronald W. P. and McGauley E. M. 1984. Temperature-reversible aggregation of two strains carnation ringspot virus. *Phytopathology* 74: 161-165.

Tremaine J. H., Ronald W. P. and Valcic A. 1976. Aggregation properties of carnation ringspot virus. *Phytopathology* 66: 34-39.

Valenzuela M., M. Pizano 1992. Distribution of carnation mottle virus and carnation ringspot virus in the Bogota Sabana. *Acta Hortic. Wageningen : international Society for Horticultural Science. Aug. (307): 221-224.*

Van der Want, J. P. H. 1951. Onderzoekingen over anjermosaiek, II. *Tijdschr. Plantenziekten* 57: 72-74.

Waterworth H. E. and J. M. Kaper. 1972. Purification and properties of carnation mottle virus and its ribonucleic acid. *Phytopathology* 62: 959-964.

Weerts J, M. Goethals, M. Verhoyen 1974. Influence of carnation mottle virus and carnatio riongsport vi rus on the productivity of carnations(*Dianthus caryophyllus*). *Rev. Agric. Brux., May/June(3): 517-528.*

Weinthaub M. & W. G. Kemp. 1961. Protection with carnation masaic virus in *Dianthus barbatus*. *Virology* 13:256-257.

Yu, Sun-Nam and Bae, Kyung Mi, 1996, Introduction of CarMV Coat Protein Gene into Carnation by *Agrobacterium tumefaciens*, *Korean J. Plant Tissue Culture*, 23(1):1-7.

Yu, Sun-Nam and Bae, Kyung Mi, 2000, Development of Viral Diseases Resistance in *Dianthus caryophyllus* by Transformation(I.Transformation of CarMV Coat Protein Gene), KOR. J. Hort. Sci. & Techmol., 18(5):665

Yu, Sun-Nam and Bae, Kyung Mi, 2000, Development of Viral Diseases Resistance in *Dianthus caryophyllus* by Transformation(II.Development of CaRSV Cp Gene expression System for Transformation), KOR. J. Hort. Sci & Technol, 18(5):665

Yu, Sun-Nam, Bae, Kyung-Mi, Lim, Pyung-Ok, 1996, Transformation of TMV-OM Strain Coat Protein Gene in *Capsicum annuum* L. for Viral Disease Resistance, Korean J. Breed, 28(1):85-91.

Yu, Sun-Nam and Forkmann, G. 2001. Biosynthetic Pathway to Floavonoids in important Ornamental Plants(I. Genus *Lillium*). Kor. J. Hort. Sci & TECHNOL 19 (SUPPL II): 34

Yu, Sun-Nam and Han, Youn-Yol. 2001. Biosynthetic Pathway to Floavonoids in important Ornamental Plants (II *Rosa-Hybrida*). Kor. J. Hort. Sci & TECHNOL 19 (SUPPL II): 34

Yu, Sun-Nam and Kim, Tae-Jung and Min, Byung-Hwan. 1999. Transformation of Dihydroflavonol 4-Reductase (DFR) Sense Gene in *Dianthus caryophyllus* L. 'Verginie' for Molecular Breeding. Korean Journal of Breeding. 31(1): 122-123